A,D

PCT/DE 99/02601

BUNDESR PUBLIK DEUTSCH AND 4

DEGG 1709 1762767

PRIORITY DOCUMENT

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)



REC'D 23 NOV 1999 WIPO PCT

Bescheinigung

Die VASOPHARM BIOTECH GMBH & CO KG inVeitshöchheim/Deutschland hat eine Patentanmeldung unter der Bezeichnung

"Isolierte und gereinigte humane lösliche Guanylylcyclase α 1/ β 1 (hsGC α 1/ β 1)"

am 14. August 1998 beim Deutschen Patent- und Markenamt eingereicht.

Der Sitz der Anmelderin wurde geändert in: Würzburg/Deutschland.

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

Die Anmeldung hat im Deutschen Patent- und Markenamt vorläufig das Symbol C 12 N 9/08 der Internationalen Patentklassifikation erhalten.

München, den 13. Oktober 1999

Deutsches Patent- und Markenamt

Der Präsident

Im Auftrag

Weihmayr

Aktenzeichen: 198 37 015.6







14. August 1998 VO/MG/sti

Zusammenfassung

Beschrieben ist die Expression der cDNA-Klone für die Untereinheiten a1 (hsGCa1) und b1 (hsGC b1) der humanen löslichen Guanylylcyclase und die nachfolgende Aufreinigung des aktiven Enzyms und dessen Anwendung, die medizinische Anwendung der Expression dieser Klone durch Gentransfer, sowie Antikörper gegen aus der Sequenz abgeleitete Peptide und deren Anwendung.



5

10



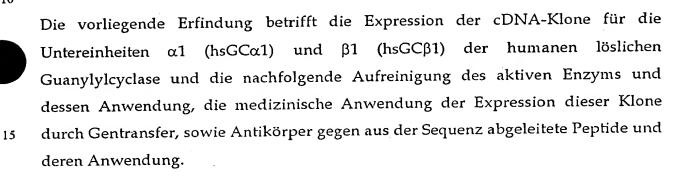
Neue deutsche Patentanmeldung VASOPHARM BIOTECH GMBH & CO. KG Unser Zeichen: 197-2 14. August 1998 VO/MG/sti

5

Isolierte und gereinigte humane lösliche Guanylylcyclase $\alpha 1/\beta 1$ (hsGC $\alpha 1/\beta 1$)

Das technische Gebiet der Erfindung

10



Diskussion des Standes der Technik

20

25

30

Das körpereigene NO/cGMP Signalsystem vermittelt wichtige Funktionen wie Vasodilatation, Hemmung der Thrombocytenaggregation, Neurotransmission und Immunabwehr und ist auch an der Entstehung verschiedener Erkrankungszustände wie Ischämie-Reperfusion und Entzündungsschäden beteiligt (Schmidt und Walter, 1994). Daher ist das NO/cGMP-System seit langem ein wichtiger Ansatzpunkt für die Entwicklung neuer Pharmaka zur Therapie der koronaren Herzkrankheit, Thromboseneigung, Herzinsuffizienz, Angina pectoris, des kardial bedingten Lungenödems, hypertensiver Krise, Entzündungs- und Infarktzuständen. Bisher werden hier verschiedene sogenannte NO-Donoren wie Glyceroltrinitrat u.a. eingesetzt, die NO freisetzen, dadurch endogenes NO ersetzen und lösliche Guanylylcyclase (sGC) aktivieren (Abb. 1). sGC bildet cGMP, das seinerseits über

verschiedene intrazelluläre Rezeptorenzyme die Wirkungen des NO/cGMP-Signalweges übermittelt. Die Gabe von NO-Donoren hat zwei Einschränkungen: 1.) führt die häufige Gabe von NO-Donoren zur Toleranz beim Patienten, d.h. Wirkungsverlust gegenüber einer erneuten Gabe. 2.) reagiert NO mit O₂ zu zytotoxischem und bzgl. der Stimulation von sGC weniger effektivem Peroxynitrit. Daher wäre eine direkte Aktivierung der sGC durch neue, nicht NO-haltige Pharmaka für die Therapie oder den Gentransfer von sGC wünschenswert. Nicht-NO-freisetzenden sGC-Stimulatoren fehlen potentiell Toleranz und NO-Toxifizierung. Mit "YC-1" (= 3-(5'-Hydroxymethyl-2'-furyl)-1-benzylindazol) wurde inzwischen ein erster solcher, nicht NO-freisetzender Aktivator von sGC in Thrombozyten beschrieben (Ko et al., 1994; Wu et al., 1995). YC-1 aktiviert auch gereinigte sGC aus Rinderlunge und potenziert die NO-Aktivierung (Friebe et al., 1996). Die Wirkung auf humane sGC ist nicht untersucht. Für ein Pharmaka-Screening steht die humane Isoform der sGC jedoch bisher nicht zur Verfügung.

Der NO-Rezeptor sGC besteht aus zwei Untereinheiten, α und β, die zusammen ein enzymatisch aktives Heterodimer bilden. In der Literatur sind jedoch drei α- und drei β-Untereinheiten, allerdings aus verschiedenen Spezies, beschrieben worden. Am besten untersucht sind die bovine α1/β1 und die Ratten-α1/β1-Isoform, die insbesondere für die kardiovaskuläre Forschung große Bedeutung haben. Ein humanes Homolog der sGC aus Rind und Ratte (z.B. sGCα1/sGCβ1-Heterodimere) war bis vor kurzem nicht bekannt. Publiziert sind cDNA-Sequenzen, die einer humanen sGC-Isoform α3 und β3 entsprechen sollten (Giuili et al., 1992). Während sGCβ3 sehr hohe Homologie zu sGCβ1 (Rind/Ratte) aufwies, enthielt die sGCα3-Sequenz zwei begrenzte Bereiche ohne Homologie zu sGCα1 (Rind/Ratte), hier als S1 und S2 bezeichnet (Abb. 2). Es war darüber hinaus nicht bekannt, ob sGCα3 und sGCβ3 eine funktionelle heterodimere sGC konstituieren können, und welche Rolle dabei die Bereiche S1 und S2 spielen. Auch keine andere humane sGC-Untereinheit wurde bisher als Protein exprimiert. Kürzlich wurden in der GenBank eine als hsGCα1 bezeichnete Sequenz veröffentlicht (Accesion-Nr. U58855), der die

Sequenzunterschiede zu sGCα1 von Rind und Ratte in den Bereichen S1 und S2 fehlen. Außerdem wurde in der GenBank kürzlich auch eine alternatives Spleißprodukt zur hsGCβ3 veröffentlicht (Accesion-Nr. AF020340), das dort als alternativ gespleißte Form der hsGCβ1 bezeichnet wird. Die physiologische Bedeutung dieser Spleißvariante von hsGCβ1/3 ist jedoch völlig unklar. Damit stellt sich die Frage, welche dieser Isoformen für welche physiologischen Funktionen in welchen Zelltypen verantwortlich ist.

10

15

20

25

30

5

Derzeit gibt es außerdem keine Antikörper gegen die humane sGCα1/β1, die monospezifisch sind, gegen die humanen Sequenzen gerichtet und deren Eignung für den Immunoblot mit humanen Geweben nachgewiesen worden ist. Bisher veröffentlichte Peptidantikörper zeigen diese Eigenschaften nur zum Teil: Harteneck al. et al. und Guthmann et verwenden eine Peptidsequenz (VYKVETVGDKYMTVSGLP), die in Guanylylcyclasen recht hohe Konservierung zeigen, so daß eine Kreuzreaktion auch mit partikulären Guanylylcyclasen (z.B. GC-C) erwartet werden kann. Guthmann et al. verwendet eine zu hsGC\(\beta\)1 identische Peptidsequenz (YGPEVWEDIKKEA) und eine bis auf zwei Aminosäureaustausche identische Peptidsequenz zu hsGCα1 (KKDVEEANANFLGKASGID). Allerdings ist die Funktion dieser Antikörper im Immunoblot nur für angereinigte hsGC aus humanen Thrombozyten gezeigt. Zusätzlich erkennen die Antiseren gegen hsGCα1 noch ein zweites, unspezifisches Produkt. Humbert et al. und Koesling et al. verwenden eine Peptidsequenz (SRKNTGTEETEQDEN) aus Rinder-sGCβ1, die teilweise (Aminosäuren 1-10) mit dem hier verwendeten Peptid (Aminosäuren 13-22) für humane sGCB1 überlappt und dort identisch ist, dessen C-Terminus (Aminosäuren 11-15) jedoch deutlich verschieden von der humanen Sequenz ist. Das Antiserum gegen dieses Peptid wurde jedoch nicht an humanem Protein getestet, sondern nur für die Immunpräzipitation der bovinen sGC verwendet.

Damit standen von der für die kardiovaskuläre Forschung wichtigen humanen Isoform $\alpha 1/\beta 1$ weder *natives* Protein, noch *rekombinantes* Protein, ein einstufiges

Reinigungsprotokoll oder spezifische Antikörper zur Verfügung. Auch ein Ansatz zur Gentherapie (z.B. mit Adenoviren o. ä.) ist bisher nicht beschrieben.

Das der Erfindung zugrundeliegende technische Problem

10

15

20

25

30

Um neue Pharmaka oder Gentransfertechniken für die kardiovaskuläre Therapie finden zu können, die weder zur Toleranz beim Patienten führen noch zytotoxisches Peroxynitrit bilden, ist eine NO-unabhängige Aktivierung von humaner sGC α1/β1 ein erfolgversprechender Ansatz. Um solche Pharmaka zu finden, ist ein nach geeigneten Wirkstoffen erforderlich. Ein solches Massenscreening Pharmakascreening nach spezifischen Aktivatoren oder Inhibitoren ist im Tierversuch zu teuer und wegen Speziesunterschieden, möglichen Nebenwirkungen und Effekten auf andere Isoformen nicht sinnvoll. Zellkultursysteme haben den Nachteil, daß nur mit erheblichem Mehraufwand festgestellt werden kann, wo Substanzen innerhalb der Signalkaskaden ihre Wirkungen entfalten. Außerdem ist die Zellkultur kostenintensiv und empfindlich. Die Aufreinigung eines Proteins aus tierischen Geweben ist aufwendig bei geringerer Ausbeute. Vor allem aber sind die Ergebnisse eines solchen Screenings aufgrund der Speziesunterschiede nur bedingt übertragbar. Hier stellt sich insbesondere die Frage nach der Bedeutung der Isoformen hsGCα1 und hsGCα3 sowie die Frage, ob hsGCβ3 tatsächlich einer humanen hsGC\beta1 entspricht. Dies ist wichtig, um das richtige Zielprotein für ein pharmakologisches Screening oder eine Gentherapie auszuwählen. Für ein optimales Screening müßte das humane Homolog des Proteins sGC $\alpha 1/\beta 1$ in großen Mengen aufgereinigt und kostengünstig zur Verfügung stehen. Eine Aufreinigung großer Mengen humanen nativen sGC-α1/β1-Proteins aus entsprechend humanem Gewebe ist nicht möglich. Daher sind für das Pharmakascreening andere Methoden nötig. Zusätzlich gibt es keine geeigneten Antikörper zum Nachweis der humanen sGCα1/β1, deren Eignung für diagnostische Zwecke z.B. im normalen Immunoblot, ELISA, RIA, EIA o.ä., gezeigt ist. Auch gibt es bisher keinen Ansatz für die therapeutisch genutzte, künstliche Expression von hsGC durch Gentransfer im Menschen.

Der Erfindung liegt somit die Aufgabe zugrunde, isolierte und gereinigte humane $sGC\alpha1/\beta1$ sowie ein Verfahren zu ihrer Herstellung und Reinigung bereitzustellen. Eine weitere Aufgabe der Erfindung ist es, Antikörper gegen die humane $sGC\alpha1/\beta1$ bereitzustellen. Außerdem ist es Aufgabe der Erfindung, Expressionsvektoren auf Basis von Adenoviren bereitzustellen, welche die cDNA der humanen $sGC\alpha1/\beta1$ enthalten. Schließlich ist es Aufgabe der Erfindung, die humane $sGC\alpha1/\beta1$ gereinigt und in handhabbaren Mengen bereitzustellen für ein Pharmakascreening nach Modulatoren, Inhibitoren und Aktivatoren der humanen $sGC\alpha1/\beta1$.



5

10

15

20

25

30

Die Lösung des vorstehenden technischen Problems wird erreicht durch die in den Patentansprüchen gekennzeichneten Ausführungsformen und die nachstehenden Erläuterungen der Erfindung.

Gegenstand der Erfindung ist somit eine isolierte und zur apparenten Homogenität gereinigte humane lösliche Guanylylcyclase $\alpha 1/\beta 1$ (hsGC $\alpha 1/\beta 1$).

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist ein Verfahren zur Herstellung der Untereinheit α1 und/oder β1 der humanen löslichen Guanylylcyclase, umfassend die Expression von die DNA-Sequenz für hsGCα1 und/oder hsGCβ1 enthaltenden Expressionsvektoren in prokaryontischen oder eukaryontischen Wirtszellen und Gewinnung der Untereinheit bzw. der Untereinheiten.

In einer bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens zur Herstellung der Untereinheit α1 und/oder β1 der humanen löslichen

Guanylylcyclase umfaßt der Schritt der Gewinnung der Untereinheit bzw. der Untereinheiten die Lyse der Zellen, die Affinitätschromatographie des Zell-Lysats und die anschließende Elution der Untereinheit bzw. der Untereinheiten.

In einer weiter bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens zur Herstellung der Untereinheit α1 und/oder β1 der humanen löslichen Guanylylcyclase enthält der Expressionsvektor zusätzlich mindestens eine DNA-Sequenz für eine Domäne zur spezifischen Affinitätschromatographie (Affinitätstag) mit anhängender Proteaseschnittstelle.

10

15

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist ein Verfahren zur Herstellung der humanen löslichen Guanylylcyclase $\alpha 1/\beta 1$ (hsGC $\alpha 1/\beta 1$), umfassend die getrennte Expression eines die DNA-Sequenz für hsGC $\alpha 1$ oder hsGC $\beta 1$ enthaltenden Expressionsvektors in prokaryontischen oder eukaryontischen Wirtszellen, Gewinnung der Untereinheiten und Kombinieren der Untereinheiten hsGC $\alpha 1$ und hsGC $\beta 1$ zur dimeren Guanylylcyclase $\alpha 1/\beta 1$ (hsGC $\alpha 1/\beta 1$).

Eine weitere Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens zur Herstellung der humanen löslichen Guanylylcyclase $\alpha 1/\beta 1$ (hsGC $\alpha 1/\beta 1$) umfaßt die Koexpression der DNA-Sequenzen für hsGC $\alpha 1$ und hsGC $\beta 1$ in prokaryontischen oder eukaryontischen Wirtszellen, die Lyse der hsGC $\alpha 1$ und hsGC $\beta 1$ enthaltenden Zellen, die Affinitätschromatographie und die anschließende Elution von hsGC $\alpha 1/\beta 1$.



20

25 Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist Verwendung einer Nukleinsäuresequenz, die die Untereinheit hsGCα1 und/oder hsGCβ1 der humanen löslichen Guanylylcyclase α1/β1 kodiert, für die somatische Gentherapie, insbesondere zur Prävention und Therapie von Arteriosklerose und ihren Folgeerkrankungen, von Restenose, Ischämie (Infarkt), peripheren arteriellen

Verschlußkrankheiten und arterieller Hypertonie sowie zur Prävention bei Patienten mit Risikofaktoren für Arteriosklerose.

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform werden Adenovektoren mit hsGCα1- oder hsGCβ1-cDNA für die somatische Gentherapie eingesetzt. Jedoch können auch andere Vektorsysteme für eine gentherapeutische medizinische Nutzung verwendet werden.

10

5

Die erfindungsgemäß beschriebenen Methoden zum Gentransfer können auch für den Gentransfer für die humane lösliche Guanylylcyclase α2 (GenBank: x63282) und für das humane Homolog zur löslichen Guanylylcyclase β2 (aus Ratte; GenBank: m57507) und für andere humane lösliche Guanylylcyclasen angewendet werden.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung betrifft Antikörper gegen humane lösliche Guanylylcyclase $\alpha 1/\beta 1$ (hsGC $\alpha 1/\beta 1$), erhältlich durch Immunisieren eines Säugers mit hsGC $\alpha 1/\beta 1$, der Untereinheit $\alpha 1$ oder $\beta 1$ immunogenen oder Peptidfragmenten davon und Isolieren der Antikörper.

Die Abbildungen zeigen:

20

15



25

30

Abbildung 1 zeigt die verschiedenen Modulationsmöglichkeiten der löslichen Guanylylcyclase (sGC-α1/sGC-β1). Die normale Aktivierung erfolgt über NO-Synthase (NOS) und NO (Stickstoffmonoxid). NO reagiert aber mit Sauerstoffradikalen u.a. zu Peroxynitrit (ONOO-), das zytotoxisch ist und sGC nur schwach aktiviert. NO kann zusätzlich über NO-Donoren wie Glycerolnitrat oder Natriumnitoprussid freigesetzt werden. Durch sGC-Modulatoren (z.B. YC-1), kann sGC direkt aktiviert werden oder aber der Aktivierungseffekt von NO auf sGC wird durch diese Modulatoren verstärkt. Durch Gentransfer (z.B. mittels adenoviraler Vektoren) läßt sich zusätzlich eine Überexpression der sGC erreichen, bzw. ein pathologisch bedingt zu geringer Expressionsspiegel ausgleichen. Es könnten auch adenovirale (oder andere) Vektoren mit sGC-Mutanten eingesetzt werden, die eine

höhere Basalaktivität zeigen. Dadurch ließe sich unabhängig von NOS, NO, NO-Donoren oder sGC-Modulatoren dauerhaft ein erhöhter cGMP-Spiegel erreichen.

Abbildung 2 zeigt einen schematischen Vergleich der sGCα1-Untereinheit von Rind bzw. Ratte mit der veröffentlichten Sequenz des als "sGCα3" bezeichneten humanen cDNA-Klons (Giuili et al., 1992). Die Balken stellen dabei das Protein dar. Dabei bezeichnet "N" den N-Terminus, "C" den C-Terminus. Markiert sind mit verschiedenen Schraffuren die funktionellen Abschnitte "regulatorische Domäne", "sGC-Homologiedomäne" und "Cyclasedomäne" dieser Proteine. Schwarz markiert sind die beiden Bereiche "S1" und "S2", für die sich keine homologen Bereiche in den Proteinen der sGCα1 von Rind und Ratte finden.

Abbildung 3 zeigt eine schematische Darstellung des humanen sGCα3-Klons mit den veröffentlichten Sequenzierfehlern (Giuili et al., 1992). Oben ist die cDNA gezeigt: Der Balken stellt den kodierenden Bereich der cDNA dar, die Striche links und rechts davon zeigen die untranslatierten Bereiche am 5′- und 3′-Ende. S1 und S2 stellen die Bereiche fehlender Homologie zu den Isoformen sGCα1 von Rind und Ratte dar (vgl. Abb. 2). Darunter sind die Positionen der Sequenzierfehler eingezeichnet: Zeile a zeigt die Nukleotidinsertionen, Zeile b die Deletionen und Zeile c die Austausche. Darunter ist ein Maßstab in Basenpaaren (bp) gezeigt. Ganz unten sind für jede der drei Zeilen a, b und c die Sequenzierfehler aufgeführt: Der Buchstabe gibt dabei die Art der betroffenen Base an, die Zahl ihre Position in der cDNA.

Abbildung 4 zeigt den Nachweis der Expression von humaner sGCα1 (A) und sGCβ1 (B) in humanen Geweben mittel PCR in cDNA-Banken. Abgebildet ist ein Foto eines ethidiumbromidgefärbten Agarosegels mit aufgetrennten PCR-Produkten unter UV-Licht. Der Pfeil links zeigt das spezifische Produkt an. Ganz unten in den Fotos sind außerdem die PCR-Primer zu sehen. Oben ist jeweils das Gewebe angegeben, aus dem die cDNA-Bank hergestellt wurde. Bei der Negativkontrolle

wurde keine cDNA zugegeben, bei der Positivkontrolle wurde Plasmid mit der cDNA der hsGCα1 zugegeben.

Abbildungen 5 und 6 zeigen die Baculovirus-Transfervektoren pVL1393 bzw. pAcG2T (jeweils ohne die hsGC-cDNA), die für die Konstruktion der rekombinanten Baculoviren zur Expression der humanen sGCα1/β1 in Sf9-Zellen verwendet wurden. Oben ist jeweils das ringförmige Plasmid mit den Restriktionsschnittstellen (Kurzname und Position in Basenpaaren), dem Gen für Ampicilin-Resistenz (Amp^K), dem "origin of replication" (ColE ori), dem Polyhedrinpromotor, der Glutathion-S-Transferase-Sequenz (nur Abb. 6) und der Multiplen Klonierungsstelle (MCS) dargestellt. Abbildung 5 zeigt unten die Multiple Klonierungstelle mit den Restriktionsschnittstellen, die nur einmal im Plasmid vorkommen. Abbildung 6 zeigt unten die Multiple Klonierungstelle mit den Restriktionsschnittstellen, die nur einmal im Plasmid vorkommen, sowie einer Thrombinschnittstelle.

Abbildung 7 zeigt die Konstruktion des Plasmids hsGCβ1-pVL1393 (ohne GST-Tag) mit der hsGCβ1-cDNA, das benutzt wurde, um durch homologe Rekombination den gentechnisch veränderten, hsGCβ1-exprimierenden Baculovirus zu erhalten. Die Vorgehensweise für das Plasmid pAcG2T-hsGCβ1 (mit GST-Tag = Glutathion-S-Transferase-cDNA aus Schistosoma japonicum) ist identisch. Mittels einer PCR wurde mit den Primern A (Basen 89-116 der hsGCβ1-cDNA + BamHI-Schnittstelle am 5′-Ende) und B (Basen 692-711 der hsGCβ1-cDNA [Gegenstrang] mit natürlicher Schnittstelle KpnI) ein Fragment hergestellt, das an seinem 5′-Ende zusätzlich eine BamHI-Schnittstelle trägt. Durch diese zusätzliche Schnittstelle konnte Fragment 1 (PCR-Fragment mit neuer BamHI-Schnittstelle) und Fragment 2 (hsGCβ1-cDNA von Schnittstelle KpnI bis Schnittstelle EcoRI) zusammen in die Schnittstellen BamHI und EcoRI des Plasmids pVL1393 inseriert werden, wodurch eine komplette hsGCβ1-cDNA unter der Kontrolle des Polyhedrinpromotors (PHP) zu liegen kommt.

Abbildung 8 zeigt die Konstruktion des Plasmids hsGCα1-pVL1393 (ohne GST-Tag) mit der hsGCα1-cDNA, das benutzt wurde, um durch homologe Rekombination den gentechnisch veränderten, hsGCα1-exprimierenden Baculovirus zu erhalten. Die Vorgehensweise für das Plasmid pAcG2T-hsGCα1 (mit GST-Tag = Glutathion-S-Transferase-cDNA aus Schistosoma japonicum) ist identisch. Mittels einer PCR wurde mit den Primern C (Basen 524-541 der hsGCα1-cDNA + BamHI-Schnittstelle am 5′-Ende) und D (Basen 1232-1249 der hsGCα1-cDNA [Gegenstrang]) ein Fragment hergestellt, das an seinem 5′-Ende zusätzlich eine BamHI-Schnittstelle und das in dem Fragment eine natürliche BsaAI-Schnittstelle trägt. Durch diese zusätzliche Schnittstelle konnte das BsaAI-gespaltene Fragment 3 (PCR-Fragment mit neuer BamHI-Schnittstelle bis BsaAI) und Fragment 4 (hsGCα1-cDNA von Schnittstelle BsaAI bis Schnittstelle EcoRI) zusammen in die Schnittstellen BamHI und EcoRI des Plasmids pVL1393 inseriert werden, wodurch eine komplette hsGCα1-cDNA unter der Kontrolle des Polyhedrinpromotors (PHP) zu liegen kommt.

Abbildung 9 zeigt den Nachweis der Expression von hsGCα1/β1 in Sf9-Zellen, die mit den oben beschriebenen gentechnisch veränderten Viren (mit hsGCα1- oder hsGCβ1 -cDNA; beide ohne GST-Tag = Glutathion-S-Transferase-cDNA aus Schistosoma japonicum) infiziert wurden. Links (A) ist ein Coomassie-gefärbtes 10 %iges SDS-Polyacrylamidgel gezeigt, auf dem durch Zentrifugation (20.000 x g) in Pellet (P) und Überstand (S) aufgetrenntes Zellhomogenat aufgtragen wurde. "Co" bezeichnet dabei die Kontrolle mit uninfizierten Sf9-Zellen. "α1" bezeichnet Sf9-Zellen, die mit Viren mit der hsGCα1-cDNA infiziert wurden, während "β1" Sf9-Zellen bezeichnet, die mit Viren mit der hsGCβ1-cDNA infiziert wurden. Die Position der hsGCα1 und hsGCβ1 im Gel ist jeweils gekennzeichnet (α1 bzw β1). Rechts davon ist ein Immunoblot mit Überstand (S) und Pellet (P) des Zellhomogenates von Sf9-Zellen gezeigt, die entweder uninfiziert (Co) oder mit hsGCα1- und hsGCβ1-Baculovirus koinfiziert wurden (α1+β1). Im Immunoblot wurden zuerst die oben beschriebenen Peptidantikörpern gegen hsGCβ1 (anti-

hsGCβ1) eingesetzt (Abb. 9B, Spuren 1-4). Anschließend wurde der Blot nochmals mit den Peptidantiköpern gegen hsGCα1 (anti-hsGCα1) entwickelt (Abb. 9B, Spuren 5-8), wodurch hier auch die hsGCβ1-Banden sichtbar sind.

Abbildung 10 zeigt den Nachweis der Guanylylcyclase-Aktivität (Bildung von cGMP aus GTP) in intakten Sſ9-Zellen, die mit den hier beschriebenen gentechnisch veränderten Baculoviren mit hsGCα1- und hsGCβ1-cDNA (beide ohne GST-Tag) koinfiziert wurden. Gezeigt ist jeweils der Gehalt an cGMP in pmol pro 106 Zellen bei unterschiedlicher Behandlung mit Pharmaka: Unten sind jeweils die zugesetzten Pharmaka angegeben. Probe 1 ist in beiden Teilgrafiken A und B unbehandelt. Bei den übrigen Proben wurde jeweils 1 mM IBMX (3-Isobutyl-1-methylxanthin) zugesetzt (oberste Zeile: schwarzer Querbalken). In der mittleren Zeile ist die in der jeweiligen Probe zugesetzte Menge an SNP in μM angegeben. Die unterste Zeile zeigt die Menge an zugesetztem YC-1 (A, links) oder ODQ (B, rechts) in μM.

15 YC-1 = 3-(5'-Hydroxymethyl-2'-furyl)-1-benzylindazol; ODQ = 1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3,-a]chinoxalin-1-on; SNP = Nitroprussidnatrium; cGMP = zyklisches 3',5'-Guanosinmonophosphat

Abbildung 11 zeigt den Nachweis der Guanylylcyclase-Aktivität (Bildung von cGMP aus GTP) im Homogenat von Sf9-Zellen, die mit den hier beschriebenen gentechnisch veränderten Baculoviren mit hsGCα1- und hsGCβ1-cDNA (beide ohne GST-Tag) koinfiziert wurden. Oben (A) ist die lösliche Zellfraktion (Überstand nach Zentrifugation bei 20000 x g) eingesetzt worden, unten (B) das zugehörige Pellet. Gezeigt ist jeweils die Menge an gebildetem cGMP in pmol pro mg Protein und pro Minute in Homogenat von Zellen, die zu verschiedenen Zeitpunkten (Angaben in Stunden) nach der Infektion mit den Baculoviren geerntet wurden. Dabei wurde die cGMP-Bildung mit (schwarze Kästchen) und ohne (weiße Kästchen) Zusatz von 100 μM SNP gemessen.

20

25

Abbildung 12 zeigt den Nachweis der Guanylylcyclase-Aktivität (Bildung von cGMP aus GTP) in Sf9-Zellen, die mit den hier beschriebenen gentechnisch veränderten Baculoviren mit hsGCβ1-cDNA (ohne GST-Tag) und hsGCα1-cDNA (mit GST-Tag = Glutathion-S-Transferase-cDNA aus *Schistosoma japonicum*) koinfiziert wurden. Gezeigt ist die Bildung von cGMP in pmol pro mg Protein und pro Minute während des Reinigungsprozesses (Affinitätschromatographie an Glutathion-Sepharose 4B). Gemessen wurde jeweils im Lysat (nach Abzentrifugieren des unlöslichen Anteils bei 20000 x g), der Überstand nach Bindung der hsGC an die Glutathion-Sepharose 4B (Durchfluß), die beiden Überstände vom Waschen der hsGC-gebundenen Glutathion-Sepharose 4B (1. und 2. Wasch) sowie der Überstand nach Elution der hsGC mit reduziertem Glutathion (1. und 2. Elution). Unterschieden wurde dabei die cGMP-Bildung ohne (schwarze Kästchen, "basal") und mit (graue Kästchen, "+100 μM SNP") Zusatz von 100 μM SNP.

5

10

20

25

30

15 <u>Abbildung 13</u> zeigt den Nachweis der natürlichen Expression von hsGCα1 und hsGCβ1 in verschiedenen humanen Geweben im Immunoblot.

Links (A) wurden die oben beschriebenen Pentidantikörner gegen hsGCα1 (anti-

Links (A) wurden die oben beschriebenen Peptidantikörper gegen hs $GC\alpha 1$ (antihs $GC\alpha 1$) eingesetzt, rechts (B) die Peptidantiköper gegen hs $GC\beta 1$ (anti-hs $GC\beta 1$).

Dabei wurde als Neagtivkontrolle jeweils in der rechten Hälfte das Peptid zugesetzt, gegen das die Antikörper gerichtet sind (Peptid: +), während in der jeweils linken Hälfte kein Peptid zugegeben wurde (Peptid: -). Auf ein 8 %iges Polyacrylamidgel wurden jeweils SDS-Extrakte von rhsGC α1- (in Teilabb. A) oder rhsGCβ1-überexprimierenden Sf9-Zellen (in Teilabb. B) (Sf9), von humanem Großhirencortex (Cortex), von humanem Cerebellum (Cerebellum) und von humaner Lunge (Lunge) aufgetragen. Die spezifischen Banden von hsGCα1 (α1) und hsGCβ1 (β1) sind jeweils mit einem Pfeil gekennzeichnet.

Abbildung 14 zeigt im Immunoblot den Nachweis der Aufreinigung von hsGCα1 (als hsGCα1/hsGCβ1-Dimere) aus Sf9-Zellen, die mit den hier beschriebenen gentechnisch veränderten Baculoviren mit hsGCα1-cDNA mit GST-Tag (=

Glutathion-S-Transferase-cDNA aus Schistosoma japonicum) und hsGCB1-cDNA (ohne GST-Tag) koinfiziert wurden. Zellysat wurde mit Glutathion-Sepharose 4B inkubiert, und der Überstand nach der Bindung aufgetragen (Überstand nach Bindung). Die Sepharose wurde zweimal gewaschen, und jeweils der Überstand dieses Waschpuffers aufgetragen (1. und 2. Waschschritt). Dann wurde eluiert durch Abspalten des hsGCα1-Proteins vom GST-Tag mit Thrombin und ein Aliquot des Überstandes aufgetragen ("Elution mit Thrombin"). Danach wurde die Glutathion-Sepharose 4B in SDS-Stoppuffer aufgenommen und ein Aliqout aufgetragen (GSH-Sepharose nach Elution). Zusätzlich wurde Glutathion-Sepharose 4B mit gebundenem hsGCa1 ohne vorherige Thrombin-Elution in SDS-Stoppuffer aufgenommen und ein Aliquot aufgetragen (GSH-Sepharose vor Elution). Der Immunoblot wurde mit den hier beschriebenen affinitätsgereinigten Peptidantikörpern gegen den C-Terminus der hsGCα1 entwickelt. Die Pfeile rechts zeigen die spezifischen Banden von hsGCα1 mit dem anhängenden GST-Tag (GSThsGC α 1) und hsGC α 1 ohne GST-Tag (hsGC α 1).

5

10

15

20

25

30

Coomassie-Brilliant-Blue-R250-gefärbten Abbildung 15 zeigt im Polyacrylamidgel den Nachweis der Aufreinigung von hsGCα1/β1 aus Sf9-Zellen, die mit den hier beschreibenen rekombinanten Baculoviren mit hsGCα1-cDNA mit GST-Tag (= Glutathion-S-Transferase-cDNA aus Schistosoma japonicum) und hsGCB1-cDNA ohne GST-Tag koinfiziert wurden. Zellysat dieser infizierten Sf9-Zellen (Lysat) wurde mit Glutathion-Sepharose 4B inkubiert, und der Überstand nach der Bindung aufgetragen (Überstand nach Bindung). Die Glutathion-Sepharose 4B wurde zweimal gewaschen, und jeweils der Überstand des Waschpuffers aufgetragen (1. und 2. Wasch). In einer Probe wurde das gebundene GSThsGCα1/β1 durch Inkubation mit reduziertem Glutathion eluiert und aufgetragen (Elution mit Glutathion). Bei den anderen Proben wurde die Glutathionsepharose mit dem Puffer für die Thrombinspaltung - ohne Thrombin - gewaschen und der Überstand dieses Puffers aufgetragen (3. Wasch). Dann wurde das hs $GC\alpha 1/\beta 1$ -Dimer eluiert durch Inkubation mit verschiedenen Mengen Thrombin und die Eluate aufgetragen (Elution mit X E/ml Thrombin) [E = Einheiten]. Verwendet wurden jeweils gleiche relative Mengen jeder Probe. Rechts sind die bei den verschiedenen Elutionsmethoden sichtbaren Banden gekennzeichnet: GST-hsGC α 1 = hsGC α 1 mit GST-Tag; hsGC α 1=hsGC α 1 ohne GST-Tag; hsGC α 1 ohne GST-Tag. Links sind Molekulargewichtsstandards auf das Gel aufgetragen, deren Größe ganz links in kDa angegeben ist.

10

15

5

Abbildung 16 zeigt die Konstruktion der rekombinanten adenoviralen hsGC-Vektoren. Die cDNAs für die hsGCα1 und hsGCβ1 (graue Balken) wurden in das adenovirale Transferplasmid pZS2 inseriert, das eine Deletion in der Adenovirus-E1-Region (ÆE1) enthält und eine in diesem Plasmid einmaligen XbaI-Schnittstelle. Dies ergab die Plasmide hsGCα1-pZS2 bzw. hsGCβ1-pZS2

Mit dem Restriktionsenzym XbaI geschnittenes hsGC α 1-pZS2 und hsGC β 1-pZS2 (mittlerer Balken, dargestellt als "sGCpZS2") wurde in die XbaI-Schnittstelle des langen Armes (oberer Balken, "RR5") von Ad5 ligiert. Dies ergab die Adenovektoren Ad5CMVhsGC α 1 bzw. Ad5CMVhsGC β 1 (unterer Balken, "Ad 5 CMV sGC"), in dem die sGC-cDNAs unter der Kontrolle des CMV-Promotors und -Enhancers liegen (CMV = Cytomegalovirus)

Abbildung 17 zeigt die Stimulierbarkeit der sGC-Aktivität durch 100 μM SNP (Natriumnitroprussid) in EA.hy926-Zellen, die mit den beiden hsGC-Adenoviren Ad5CMVhsGCα1 und Ad5CMVhsGCβ1 koinfiziert worden waren (Proben A - C) und bei uninfizierten EA.hy926-Zellen (Ansatz D). Auf der Y-Achse ist die Bildung von pmol cGMP pro mg Protein und pro Minute aufgetragen. Die dunklen Balken zeigen die basale cGMP-Bildung ohne SNP-Stimulierung, die hellen Balken stellen die cGMP-Bildung nach SNP-Stimulierung dar.

Abbildung 18 zeigt die DNA-Sequenz der humanen löslichen Guanylylcyclase $\alpha 1$ (hsGC $\alpha 1$); SEQ ID NO: 1.

Abbildung 19 zeigt die Aminosäuresequenz der humanen löslichen Guanylylcyclase $\alpha 1$ (hsGC $\alpha 1$); SEQ ID NO: 2.

Abbildung 20 zeigt die DNA-Sequenz der humanen löslichen Guanylylcyclase β1 (hsGCβ1); SEQ ID NO: 3.

Abbildung 21 zeigt die Aminosäuresequenz der humanen löslichen Guanylylcyclase β 1 (hsGC β 1); SEQ ID NO: 4.

Abbildung 22 zeigt die Aminosäuresequenz des Peptids, das zur Herstellung von Antikörpern gegen die humane lösliche Guanylylcyclase α1 (hsGCα1) verwendet wurde (entspricht Aminosäuren 634-647 der hsGCα1); SEQ ID NO: 5.

Abbildung 23 zeigt die Aminosäuresequenz des Peptides, das zur Herstellung von Antikörpern gegen die humane lösliche Guanylylcyclase β1 (hsGCβ1) verwendet wurde (entspricht Aminosäuren 593-614 der hsGCβ1); SEQ ID NO: 6.

Abbildung 24 zeigt die DNA-Sequenz des PCR-Primerpaares für die humane lösliche Guanylylcyclase a1 (hsGCa1). Oberer Primer (entspricht Nukleotide 524-541 der hsGCα1-cDNA-Sequenz mit angehängter Restriktionsschnittstelle für BamHI); SEQ ID NO: 7. Unterer Primer (entspricht 1249-1232 der hsGCα1-cDNA-Sequenz [Gegenstrang]); SEQ ID NO: 8.

Abbildung 25 zeigt die DNA-Sequenz des PCR-Primerpaares für die humane lösliche Guanylylcyclase β1 (hsGCβ1). Oberer Primer (entspricht Nukleotide 89-106 der hsGCβ1-cDNA-Sequenz mit angehängter Restriktionsschnittstelle für BamHI); SEQ ID NO: 9. Unterer Primer (entspricht Nukleotide 692-711 der hsGCβ1-cDNA-Sequenz [Gegenstrang]); SEQ ID NO: 10.

25

20

5

T)

Vorteile der Erfindung und die Lösung der oben angeführten technischen Probleme durch diese Erfindung

1.) Die in der Literatur als sGCα3 und sGCβ3 beschriebenen cDNA-Klone wurden als humane Homologe der sGCα1 und sGCβ1 aus Rind und Ratte identifiziert, und werden nachfolgend als humane sGC α1 (hsGCα1) und humane sGC β1 (hsGCβ1) bezeichnet. Diese sGCα1/β1-Isoform ist nach dem aktuellen Wissensstand wegen ihrer Funktion im kardiovaskulären System als die pharmakologisch wichtigere anzusehen. Da der Originalklon von hsGCα3 untersucht wurde, konnte gezeigt werden, daß nicht hsGCα1 und hsGCα3 parallel existieren, sondern nur die Form hsGCα1. Damit ist ein eindeutiges Zielprotein für ein pharmakologisches Massenscreening und die Gentherapie identifiziert.

5

10

15

20

25

30

- 2.) Durch das erfindungsgemäße Verfahren wird erstmals die funktionell aktive Expression humaner sGC erreicht. Damit ist erstmals das zugehörige Protein durch gentechnische Methoden herstellbar.
 - 3.) erfindungsgemäßen gegen Protein das sGCgerichteten Peptidantikörpern ist ein Nachweis der Expression in humanen Geweben, sowie die Diagnostik von Dysfunktionen (zu hohe/niedrige oder fehlende sGC-Expression) möglich. Außerdem stellt die Erfindung die technischen Voraussetzungen bereit, die zur weiteren Aufklärung der Transkriptions- und Translationskontrolle von hsGC nötig sind. Die erfindungsgemäßen Peptidantikörper haben den Vorteil, daß sie monospezifisch sind, gegen die humanen Sequenzen gerichtet sind und außerdem ihre Eignung für den Immunoblot mit humanen Geweben nachgewiesen worden ist. Andere Peptidantikörper zeigen diese Eigenschaften nur zum Teil: Harteneck et al. und Guthmann et al. verwenden eine Peptidsequenz (VYKVETVGDKYMTVSGLP), die in Guanylylcyclasen recht hohe Konservierung zeigen, so daß eine Kreuzreaktion auch mit partikulären Guanylylcyclasen (z.B. GC-C) werden kann. Guthmann et al. verwendet außerdem eine zu hsGC\$1 identische Peptidsequenz (YGPEVWEDIKKEA) und eine bis auf zwei Aminosäureaustausche

identische Peptidsequenz zu hsGCα1 (KKDVEEANANFLGKASGID). Allerdings ist die Funktion dieser Antikörper im Immunoblot nur für angereinigte hsGC aus humanen Thrombozyten gezeigt worden. Zusätzlich erkannten diese Antikörper gegen hsGCα1 noch ein zweites, unspezifisches Produkt. Humbert et al. und Koesling et al. verwendeten eine Peptidsequenz (SRKNTGTEETEQDEN) aus Rinder-sGCβ1, die teilweise (Aminosäuren 1-10) mit dem hier verwendeten Peptid (Aminosäuren 13-22) für hsGCβ1 identisch ist, dessen C-Terminus (Aminosäuren 11-15) jedoch deutlich verschieden von der humanen Sequenz ist. Das Antiserum gegen dieses Peptid wurde jedoch nicht an humanem Protein getestet, sondern nur für die Immunpräzipitation der bovinen sGC verwendet.

10

15

5

Zusätzlich zu den in Abbildung 22 und 23 dargestellten Peptiden und deren immunogenen Fragmenten zur Herstellung der erfindungsgemäßen Antikörpern gegen hsGCα1 oder hsGCβ1 in Kanninchen ist auch die Herstellung von monoklonalen oder polyklonalen Antikörpern gegen das ganze hsGCα1/β1-Protein oder seine Spaltprodukte möglich. Dabei können verschiedene Tierarten (vorzugsweise Maus, Ratte, Kaninchen) zur Antikörperherstellung eingesetzt werden.

4.) Durch die erfindungsgemäße Expression im eukaryontischen Baculovirus/Sf9-20 System kann die humane l'sliche Guanylylcyclase \alpha 1/\beta 1 in großen Mengen hergestellt werden. Das Anhängen einer Nukleotidsequenz, die für ein für die Affinitätschromatographie geeignetes Polypeptid kodiert (Affinitätstag, Glutathion-S-Transferase = GST-Tag), mit einer anschließenden Proteaseschnittstelle 25 am N-Terminus der cDNA der \alpha1-Untereinheit erlaubt die schnelle und einfache Aufreinigung des koexprimierten, dimeren Proteins durch einen einzigen affinitätschromatografischen Schritt. Das anhängende Affinitätstag wird anschließend durch Proteaseverdau wieder entfernt, wodurch hinsichtlich der Primärstruktur ein dem nativen identisches Protein erhalten wird. Durch diese revolutionär schnelle und saubere Gewinnung großer, hochreiner Mengen an 30

funktioneller humaner sGC ergeben sich neue Möglichkeiten für ein Massenscreening nach spezifischen Aktivatoren und Inhibitoren sowie für die pharmakologische Charakterisierung der potentiellen Arzneistoffe.

Eine Aufreinigung von hsGCα1/β1 kann auch erfolgen durch Ionenaustausch-Chromatographie, Gelfiltration, Immunaffinitäts-Chromatographie und andere chromatographische Verfahren, z.B. an ATP-, GTP-, cGMP- oder Blue-Sepharose, und anderen derartigen Chromatographiemedien.

10

15

20

25

30

5.) Das erfindungsgemäße Verfahren ist in identischer Weise für andere Isoformen des Enzyms bei Mensch, Ratte und Rind einsetzbar. In dem erfindungsgemäßen Verfahren können verschiedene Affinitätstagstags (z.B. Histidin-Oligomer) und verschiedene Expressionssysteme wie z.B. E. coli eingesetzt werden. Andere Bereiche aus der hsGCα1- und hsGCβ1-Sequenz können ebenfalls zur Herstellung von Antikörpern gegen Peptide oder das ganze Protein verwendet werden.

6.) Für die moderne Pharmakaentwicklung ist die Verfügbarkeit großer Mengen eines isolierten humanen Proteins in hoher Reinheit und von hoher Qualität essentiell. Diese Voraussetzung war für die Suche nach Alternativen zu den klassischen NO-Donoren bisher nicht gegeben. Ein Massenscreening nach spezifischen Aktivatoren oder Inhibitoren ist im Tierversuch zu teuer und wegen Speziesunterschieden, möglichen Nebenwirkungen und Effekten auf andere Isoformen nicht sinnvoll. Zellkultursysteme haben den Nachteil, daß nur mit erheblichem Mehraufwand festgestellt werden kann, wo Substanzen innerhalb der Signalkaskaden ihre Wirkungen entfalten. Außerdem ist die Zellkultur kostenintensiv und empfindlich. Die Aufreinigung eines Proteins aus tierischen Geweben ist, im Vergleich zur Expression eines Proteins mit rekombinanter DNA-Technologie, aufwendiger bei geringerer Ausbeute. Vor allem aber sind die Ergebnisse eines Pharmakascreenings aufgrund der Speziesunterschiede nur bedingt übertragbar. Die rekombinante hsGCα1/β1 dagegen ist durch die erfindungsgemäßen Verfahren in großen Mengen kostengünstig verfügbar und

liefert im Screening eindeutige Aussagen über Modulation, Aktivierung oder Inhibition dieses speziellen humanen Enzyms. Speziesunterschiede und mangelnde Übertragbarkeit auf den Menschen sind durch Verwendung eines humanen Enzyms a priori ausgeschlossen.

5

Weiterhin steht so für Kristallisation und Strukturaufklärung hsGC in großen Mengen und ausreichender Reinheit zur Verfügung. Hierdurch ist eine wichtige Voraussetzung für ein rationelles Pharmako-Design mittels Molecular Modelling erfüllt.

10

7.) Zusätzlich zur Verwendung der isolierten hs $GC\alpha 1/\beta 1$ können intakte Sf9-Zellen, die durch Infektion mit den hier beschriebenen rekombinanten Baculoviren hs $GC\alpha 1/\beta 1$ exprimieren, für in-vitro-Versuche eingesetzt werden.

8.) Durch Gentransfer läßt sich eine vorübergehende (z.B. mit adenoviralen

Vektoren) oder dauerhafte Überexpression erreichen, wodurch der cGMP-Spiegel

auch bei geringer NO-Konzentration oder schlechterer Aktivierung der sGC durch

Peroxynitrit-Bildung erhöht werden kann. Dieser Ansatz bietet außerdem

konzeptionelle Vorteile gegenüber einem Gentransfer von NOS (NO-Synthase), da

mit dem erfindungsgemäßen Ansatz die Bildung von zytotoxischem, und bezüglich

15

20

- der Aktivierung von sGC weniger effektivem Peroxynitrit umgangen wird. Außerdem ließe sich (z.B. für therapeutische Zwecke) durch Gentransfer von sGC-
- Mutanten mit erhöhter Basalaktivität unabhängig von NOS, NO, NO-Donoren oder
- sGC-Modulatoren eine dauerhafte Erhöhung des cGMP-Spiegels erreichen.

25

30

9.) Zusätzlich zu dem beschriebenen Reinigungsverfahren für hsGC α 1/ β 1 ist eine Aufreinigung aus Sf9-Zellen nach Infektion mit den beschriebenen Baculoviren mit hsGC α 1- oder hsGC β 1-cDNA auch möglich, wenn mit hsGC α 1-Baculoviren ohne GST-Tag (GST-Tag = angehängte Glutathion-S-Transferase-Sequenz aus *Schistosonia japonicum*) und hsGC β 1-Baculoviren mit GST-Tag koinfiziert wird, sowie bei

Koinfektion von hs $GC\alpha 1$ -Baculoviren mit GST-Tag und hs $GC\beta 1$ -Baculoviren mit GST-Tag.

Außerdem ist zusätzlich zum Einsatz von loser Glutathion-Sepharose 4B auch die Verwendung einer Säule mit Glutathion-Sepharose 4B möglich.

Eine Aufreinigung kann auch erfolgen, indem nach einer Elution des dimeren Fusionsproteins GST-hsGC α 1/ β 1 mittels reduziertem Glutathion von der Glutathion-Sepharose 4B dieses Fusionsprotein mit Thrombin verdaut wird. Nach Dialyse (zur Entfernung des reduzierten Glutathions) kann dann das abgespaltene GST-Tag durch erneute Affinitätschromatographie an Glutathion-Sepharose 4B aus dem Gemisch entfernt werden.

10

10.) Das erfindungsgemäße Verfahren kann auch für die humane lösliche Guanylylcyclase α2 (GenBank: x63282) und ein eventuell existierendes humanes Homolog zur löslichen Guanylylcyclase β2 (aus Ratte; GenBank: m57507), sowie für andere humane lösliche Guanylylcyclasen angewendet werden (in allen hier aufgeführten technischen Varianten).



Die Beispiele erläutern die Erfindung.

5

10

15

20

hsGC α 1.

Beispiel 1

Die korrigierte Sequenz von IsGC α 1 und IsGC β 1

Die Orginalklone der humanen Isoformen sGCα3 und sGCβ3 (Giuili et al., 1992)

wurden erneut sequenziert. Während die Sequenz des sGCβ3-Klones bestätigt wurde (siehe SEQ ID NO: 3 und Abb. 20), ergab die Sequenzierung von sGCα3, daß die Originalpublikation (Giuili et al., 1992) 19 Sequenzierfehler enthält, die in einer Übersicht in Abb. 3 zusammengefaßt sind. Die entsprechend korrigierte α3-cDNA-Sequenz ist in SEQ ID NO: 1 und Abb. 18 dargestellt. Die abgeleitete Aminosäuresequenz ist in SEQ ID NO: 2 und Abb. 19 dargestellt. Die korrigierte Sequenz (siehe SEQ ID NO: 1 und Abb. 18) ist darüberhinaus identisch mit der in der GenBank veröffentlichten humanen sGCα1-Sequenz (Accesion-Nr. U58855), wobei allerdings der 5′-untranslatierte Bereich der hier vorgestellten Sequenz um 506 Basenpaare länger ist. "sGCα3" wird daher jetzt als humane sGCα1 (hsGCα1)

Tabelle 1 Revidierte Terminologie von löslichen Guanylylcyclase-cDNAs und -proteinen, und ihr Nachweis in humanem Gewebe .

klassifiziert. Damit ist gezeigt, daß beim Menschen nicht zwei verschiedene hsGCa-

Untereinheiten al und as vorkommen, die für die kardiovaskuläre Forschung von

Bedeutung sein könnten, sondern - analog zur Situation bei Rind und Ratte - nur

	humane sGC-Untereinheiten	
	α	β
Isoform 1	cDNA und Protein nachweisbar	cDNA und Protein nachweisbar
	aktiv, wenn k	oexprimiert
Isoform 2	cDNA nachweisbar	
	aktiv, wenn mit bovi	ner B1 koexprimiert

10

15

20

25

30

Die Expression von sGClpha1- und sGCeta1-mRNA in humanen Geweben wurde mittels PCR gezeigt (Abb. 4). Die Amplifikation eines hsGCβ1-Fragmentes mit einem PCR-Primerpaar (5'-AAAAGGATCCATGTACGGATTTGTGAAT-3' = Nukleotide 89-106 hsGCβ1-cDNA-Sequenz mit angehängter Restriktionsschnittstelle; ATGCGTGATTCCTGGGTACC-3' = 692-711 der hsGCβ1-cDNA-Sequenz) bei einer Annealing-Temperatur von 54°C ergab jeweils eine spezifische Bande in cDNA-Banken aus Hirn, Herz, Niere, Lunge, Pankreas und Skelettmuskel. Die Identität des amplifizierten Fragmentes wurde durch Sequenzierung bestätigt. Die Amplifikation PCR-Primerpaar hsGCα1-Fragmentes mit einem eines AAAAGGATCCATGTTCTGCACGAAGCTC-3' = Nukleotide 524-541 der hsGCα1-5′-Restriktionsschnittstelle; angehängter cDNA-Sequenz mit ATTATGGAAGCAGGAGG-3' = 1249-1232 der hsGCα1-cDNA-Sequenz) bei einer Annealing-Temperatur von 54° C ergab jeweils eine spezifische Bande in cDNA-Banken aus Herz (Abb. 4A) und Lunge (nicht gezeigt). Die Sequenzierung der Fragmente ergab in jedem Fall die korrigierte hsGCα1-Sequenz; die von Giuili et al. publizierte "sGCα3"-Sequenz wurde nicht gefunden. Damit wurde gezeigt, daß beim Menschen nur eine hsGCα1/β1 vorhanden ist, während die mutmaßliche hsGCα3/β3 lediglich auf Sequenzierfehlern beruht. Dadurch ergibt sich für die kardiovaskuläre Forschung ein klares Bild bezüglich der sGC-Isoform, die im Targetprotein für das Pharmaka-Screening ist.

Beispiel 2

Konstruktion von rekombinanten Baculoviren für die Expression lumaner s $GC\alpha$ und s $GC\beta$ in Insektenzellen

Zum Nachweis, daß hsGCα1 und hsGCβ1 funktionelles, heterodimeres sGC-Protein konstituieren können, wurden die beiden cDNAs in Baculovirus eingebracht, mit

dessen Hilfe ein rekombinantes Protein unter der Kontrolle des starken Polyhedrinpromotors in Insektenzellen (Sf9-Zellen) exprimiert wurde. Zur Herstellung der rekombinanten Baculoviren wurde der Baculovirus-Transfervektor pVL1393 (Fa. Pharmingen, San Diego, California, USA; Abb. 5) bzw. der Baculovirus-Transfervektor pAcG2T (mit Glutathion-S-Transferase-Sequenz aus Schistosoma japonicum und Thrombinschnittstelle; Fa. Pharmingen; Abb. 6) verwendet, in den die Fremdgene (hsGCα1 und hsGCβ1) kloniert wurden. Die Kotransfektion eines solchen rekombinanten pVL1393- oder pAcG2T-Plasmids mit BaculoGold Baculovirus-DNA (Pharmingen) erlaubte die direkte Isolation der durch homologe Rekombination entstandenen gentechnisch veränderten Baculoviren mit hsGCα1- oder hsGCβ1-cDNA aus dem Zellkulturmedium.

Die Konstruktion von pVL1393-hsGCβ1 ist in Abb. 7 schematisch dargestellt (identische Vorgehensweise für pAcG2T-hsGCβ1). Es wurde der kodierende Bereich der hsGCβ1 cDNA mit der 3'-untranslatierten Region, jedoch ohne die 5'-untranslatierte Region, in pVL1393 kloniert. Dazu wurde mittels PCR mit den Primern A und B eine BamHI-Schnittstelle unmittelbar in 5'- Richtung des für das Start-Methionin codierenden Codons eingeführt. Das so amplifizierte Fragment 1 wurde mit BamHI/KpnI verdaut; Fragment 2 wurde mit KpnI/EcoRI aus dem sGCβ1-cDNA-Klon isoliert. Die Fragmente 1 und 2 sowie der BamHI/EcoRI-geöffnete Vektor wurden ligiert (siehe Abb. 7).

Die Konstruktion von pVL1393-hsGCα1 ist in Abb. 8 schematisch dargestellt (identische Vorgehensweise für pAcG2T-hsGCα1). Es wurde der kodierende Bereich der hsGCα1 cDNA mit der 3'-untranslatierten Region, jedoch ohne die 5'-untranslatierte Region, in pVL1393 kloniert. Dazu wurde mittels PCR mit den Primern C und D eine BamHI-Schnittstelle unmittelbar in 5'-Richtung des für das Start-Methionin codierenden Codons eingeführt. Das so amplifizierte Fragment 3 wurde mit BamHI/BsaAI verdaut; Fragment 4 wurde mit BsaAI/EcoRI aus dem

sGCα1-cDNA-Klon isoliert. Die Fragmente 3 und 4 sowie der BamHI/EcoRI-geöffnete Vektor wurden ligiert (siehe Abb. 8).

Zur Herstellung der rekombinanten hsGCα1- und hsGCβ1-Baculoviren wurde jeweils der Baculovirus-Transfervektor (pVL1393-hsGCα1, pAcG2T-hsGCα1, pVL1393-hsGCβ1, pAcG2T-hsGCβ1) mit Baculovirus-DNA (Baculo-Gold; Fa. Pharmingen, San Diego, California, USA) in Sf9-Monolayer-Zellkulturen kotransfiziert. Die Zellen wurden dazu bei 27°C in IPL-41-Medium (Gibco) kultiviert, das mit 10 % (Vol/Vol) fötalem Kälberserum (Biochrom), 4 % (Vol/Vol) Tryptose-Phosphat-Broth (Gibco), 1 % (Vol/Vol) Pluronic F68 (Gibco), 0,5 % Amphotericin B (Gibco), 80 μg/ml Gentamycinsulfat (Gibco) und 0.5 mM δ-Aminolävulinsäure (Merck) suppelementiert war. Rekombinante hs $GC\alpha 1$ - und hsGCβ1-Baculovirenklone wurden mittels Plaque-Reinigung aus dem Kulturmedium gewonnen. Zur Herstellung von Virusstammlösungen mit hohem Titer wurden Sf9-Schüttelkulturen (0,5 x 10^6 Zellen/ml) mit einer M.O.I. (multiplicity of infection) von 0,1 pfu/Zelle (pfu = Plaque-bildende Einheiten) infiziert und 6 Tage nach der Infektion geerntet.

20

25

30

5

10

15

Beispiel 3

Produktion von rekombinanter lis $GC\alpha 1$ und lis $GC\beta 1$ in Sf9-Zellen

Jeweils 10 rekombinante hsGCα1- und hsGCβ1-Baculovirenklone wurden bezüglich der Expression von rekombinantem Protein in Sf9-Zellen getestet. Dazu wurden Sf9-Monolayer-Zellkulturen mit plaquegereinigtem, rekombinatem hsGCα1- oder hsGCβ1-Baculovirus infiziert, 5 Tage bei 27°C kultiviert, mit einem Gummischaber geerntet, in 0,5 ml Lysispuffer (25 mM TEA, pH 7.8, 50 mM NaCl, 1mM EDTA, 5 mM DTT, 1 μM Leupeptin, 0,5 mg/l Trypsininhibitor) resuspendiert und mit Ultraschall homogenisiert ("Sonifier 250", "Standard"-Spitze, Branson; 15-mal, "duty cycle": 15 %, Intensität: 1). Nach Zentrifugation der Homogenate bei 20.000 x g

wurden Überstand und Pellet in einer SDS-PAGE analysiert. Drei der hsGCß1-Baculovirenklone und zwei der hsGCα1-Baculovirenklone lieferten rekombinantes Protein in Mengen, die in der unlöslichen Fraktion durch Färbung mit Coomassie-Brilliant-Blue R250 sichtbar gemacht werden konnten. Rekombinante humane sGCa sGC_B (rhsGCa und rhsGCβ) wanderten mit einem apparenten Molekulargewicht von 79,5 (hsGCα1) bzw. 68,5 kDa (hsGCβ1), was den aus der abgeleiteten Aminosäuresequenz vorhergesagten Molekulargewichten sehr nahe kommt (77,5 bzw. 70,5 kDa) (repräsentative Klone in Abb. 9). Die Baculovirenklone, die im Immunoblot die höchsten Expression von rekombinantem Protein zeigten, wurden für die Expression funktioneller heterodimerer hsGC verwendet [siehe Beispiele 4 bis 7.]

5

10

15

20

25

30

Beispiel 4

Rekombinante humane sGC in intakten Insektenzellen ist aktiv und NO-stimulierbar

Zur Herstellung funktioneller heterodimerer humaner sGC wurden rhsGCα1 und rhsGCβ1 über die rekombinaten Baculoviren in Sf9-Zellen koexprimiert. Dazu wurden Sf9-Monolayerkulturen [2,5 x 10⁶ Zellen/Petrischale, Ø 90 mm; Supplemente siehe Ziffer 2.)] mit einer M.O.I. (multiplicity of infection) von 2 pfu/Zelle für jeden rekombinanten Baculovirus (hsGCα1 und hsGCβ1; beide ohne GST-Tag) koinfiziert und für 48 h bei 27°C kultiviert. Die basale sowie die NO-stimulierbare Aktivität der sGC in den Zellen wurde durch Messung des cGMP-Gehaltes der Zellen in Anwesenheit des Phosphodiesterase-Inhibitors IBMX (3-Isobutyl-1-methylxanthin) bestimmt.

Zur Bestimmung des cGMP-Gehaltes wurde das Kulturmedium durch Krebs-Ringer-Puffer (KRB), welcher zusätzlich 1mM IBMX enthielt, ersetzt (119 mM NaCl; 4,74 mM KCl; 2,54 mM CaCl₂; 1,19 mM MgSO₄; 1,19 mM KH₂PO₄; 25 mM NaHCO₃; 10 mM HEPES, pH 7,4; 0,1% BSA), und die Zellen für eine Stunde bei 27°C

kultiviert. Anschließend wurden die Zellen mit eiskaltem KRB gewaschen und mit einem Gummischaber in 1 ml eiskaltem Ethanol (80 %) geerntet. Die Zellen wurden mit Ultraschall homogenisiert [siehe oben unter Ziffer 3.)] und für 20 min bei 20000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde in einem Vakuumkonzentrator getrocknet und der Rückstand anschließend in 25 mM TEA, pH 7,8 resuspendiert. Der cGMP-Gehalt wurde im RIA bestimmt (Biotrend).

Die Koexpression von rhsGCα1 und rhsGCβ1 führte zur Bildung funktioneller sGC mit basaler Aktivität in Sf9-Zellen (Abb. 10): Während nicht infizierte Sf9-Zellen etwa 0,1 pmol cGMP/10⁶ Zellen enthielten (nicht gezeigt), wurde in rhsGC-exprimierenden Zellen etwa 20 pmol cGMP/10⁶ Zellen gefunden (Abb. 10). Diese basale Aktivität rekombinanter hsGC war durch einen NO-Donor, SNP (Natriumnitroprussid), stimulierbar. Wurden die Zellen vor der Ernte für 2 min mit 10, 100 oder 1000 μM SNP inkubiert, stieg der cGMP-Gehalt konzentrationsabhängig auf den bis zu 50-fachen Wert an (Abb. 10).

Beipiel 5

Rekombinante lumane sGC in Insektenzellextrakten ist aktiv und NO-stimulierbar

20

25

30

5

10

15

Die Aktivität der rekombinanten hsGC (nach Expression mit den oben beschriebenen rekombinanten Baculoviren) wurde nicht nur in intakten Sf9-Zellen nachgewiesen, sondern auch in Sf9-Zellextrakten. Zur Herstellung solcher Extrakte wurden Sf9-Schüttelkulturen [2 x 106 Zellen/ml; Supplemente siehe Beipiel 2] mit einer M.O.I. (multiplicity of infection) von 1 pfu/Zelle für jedes Virus (hsGCα1 und hsGCB1; beide ohne GST-Tag) koinfiziert und bei 27°C kultiviert. 0, 24, 48, 72, 96 und 118 h nach der Infektion wurden Proben gezogen (4 ml), die Zellen sedimentiert, in 1 ml Lysispuffer resuspendiert und mit Ultraschall homogenisiert [siehe Beispiel 3]. Die Homogenate wurden 15 min bei 20000 x g zentrifugiert, und das unlösliche Pellet wurde erneut in Lysispuffer resuspendiert. Die Proben wurden auf 50 Glycerin (Vol/Vol) gebracht und bei -20°C gelagert. Die

Proteinkonzentrationen wurden spektrophotometrisch mit der Standardmethode von Bradford bestimmt (Bradford, 1976). Die sGC-Aktivität wurde durch die Umsetzung von [α³²P]-GTP zu [³²P]-cGMP bestimmt (Schultz und Böhme, 1984). Die Reaktionsansätze enthielten 50 mM TEA (pH 7,4), 3 mM MgCl₂, 3 mM DTT, 1 mM IBMX, 1 mM cGMP, 5 mM Kreatinphosphat, 0,25 mg/ml Kreatinkinase und 500 μM GTP in einem Gesamtvolumen von 100 μl, und wurden für 10 min bei 37°C inkubiert. Die Reaktionen wurden durch gleichzeitige Zugabe von Zellextrakt und den sGC-Aktivatoren SNP, CO oder YC-1 gestartet. Das gebildete [³²P]cGMP wurde gemessen wie beschrieben (Schultz und Böhme, 1984).

Basale rhsGC-Aktivität (d.h. cGMP-Bildung durch rshGC *oline* Aktivierung des Enzyms durch Zugabe von NO oder anderen Aktivatoren) wurde hauptsächlich in der löslichen Sf9-Zellfraktion gefunden (Abb. 11A), war 72 h nach Infektion der Zellen maximal, und wurde mit 100 μM SNP bis zu 5-fach stimuliert (Abb. 11A). Die Pelletfraktion enthielt zu keinem Zeitpunkt meßbare basale sGC-Aktivität; unter SNP-Stimulation wurde eine geringe sGC-Aktivität gefunden (Abb. 11B).

Beispiel 6 Einfluß von YC-1 und ODQ auf rekombinante lumane sGC

Mit 1 [1,2,4]c Aktivit

20

10

15

Mit YC-1 (3-(5'-Hydroxymethyl-2'-furyl)-1-benzylindazol) und ODQ (1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3,-a]chinoxalin-1-on) sind Substanzen beschrieben, welche die Aktivität von sGC spezifisch beeinflussen können. Es wurde daher untersucht, ob dies auch für rhsGC zutrifft.

Nach Expression mit den oben beschriebenen rekombinanten Baculoviren (ohne GST-Tag) wurde die rhsGC in intakten Sf9-Zellen durch YC-1 aktiviert, und auch der NO-potenzierende Effekt wurde gefunden: der cGMP-Gehalt rhsGC-exprimierender Zellen wurde durch Inkubation mit 10 μM YC-1 für 2 min um das 3,4-fache erhöht (Abb. 10A). 100 μM YC-1 hatten den gleichen Effekt (Abb. 10A).

Wurden die Zellen gleichzeitig mit YC-1 und 100 μ M SNP behandelt, verdoppelten

sich die cGMP-Spiegel, verglichen mit den durch SNP allein erreichten cGMP-Spiegeln (Abb. 10A). Ähnliche Resultate wurden mit rhsGC in Zellextrakten erzielt. ODQ ist als selektiver Inhibitor NO-stimulierter sGC beschrieben, der jedoch nicht die Basalaktivität hemmt (Garthwaite et al., 1995). In rhsGC-exprimierenden Sf9-Zellen (nach Expression mit den oben beschriebenen rekombinanten Baculoviren, ohne GST-Tag) hatte ODQ keinen Einfluß auf die basalen cGMP-Spiegel; die Stimulation von rhsGC in intakten Zellen mit SNP wurde jedoch durch gleichzeitige Inkubation mit ODQ inhibiert (Abb. 10B).

10

15

20

25

30

5

Beispiel 7

Gewinnung der gereinigten humanen Guanylylcyclase $\alpha 1/\beta 1$ (hsGC $\alpha 1/\beta 1$)

Zur Reinigung der rekombinanten humanen sGCα1/β1 aus den Sf9-Zellen, wurde ein rekombinanter Baculovirus [siehe Beispiel 2] eingesetzt, bei dem ein Fusionsprotein aus hsGCα1 und anhängendem GST [der sogenannte GST-Tag; GST = Glutathion-S-Transferase aus Schistosonna japonicum; vgl. Bsp. 2] gebildet wird. Über diesen GST-Tag, der mit hoher Affinität Glutathion bindet, ist eine spezifische Affinitätschromatographie an Glutathion-Sepharose 4B, (Fa. Pharmacia, Freiburg) möglich. Die mit hsGCα1-Baculoviren (mit GST-Tag) und hsGCβ1-Baculoviren (ohne GST-Tag) koinfizierten Sf9-Zellen wurden in 25 mM Triethanolamin pH 7,8 / 1 mM EDTA / 5 mM DTT / 1 μ M Leupeptin / 0,5 μ g/ml Trypsininhibitor / 0,2 mM PMSF lysiert (30 min hypotone Lyse bei 4°C). Nach Zugabe von NaCl auf 75 mM Endkonzentration wurde das Homogenat für 1h bei 75000 x g und 4°C abzentrifugiert und der Überstand mit GSH-Sepharose 4B für eine Stunde bei Raumtemperatur gemischt. Die Glutathion-Sepharose 4B wurde dann bei 500 x g für 5 min abzentrifugiert und der Überstand abgenommen. Die Glutathion-Sepharose 4B wurde mit dem 10fachen Volumen 50 mM Tris-HCl (pH 8,0) / 150 mM NaCl / 2,5 mM CaCl₂ / 0,1 % β-Mercaptoethanol versetzt, für eine Minute gemischt und erneut bei 500 x g für 5 min abzentrifugiert. Der Überstand wurde wiederum abgenommen und die Glutathion-Sepharose 4B nochmals auf die gleiche Art

gewaschen. Die Elution erfolgte dadurch, daß das hsGCα1-Protein (mit dem daran gebundenen hsGCβ1) durch Thrombin an der spezifischen Schnittstelle von dem GST-Tag getrennt wurde, der an die Glutathion-Sepharose 4B gebundenen blieb. Der Thrombinverdau erfolgte dabei in 50 mM Tris-HCl (pH 8,0) / 150 mM NaCl / 2,5 mM CaCl₂ / 0,1 % β-Mercaptoethanol mit 0,25 bis 1 Einheiten Thrombin / ml Puffer für 1 oder 3 Stunden bei Raumtemperatur. Die Glutathion-Sepharose 4B (mit dem GST-Tag) wurde erneut 5 min bei 500 x g abzentrifugiert und der Überstand mit der abgespaltenen hsGCα1/β1 abgenommen. Eine andere Elutionsmethode erfolgte durch Zugabe von 50 mM Tris-HCl (ph 8,0) / 5 mM reduziertes Glutathion und Mischen für 30 min bei Raumtemperatur. Dadurch wurde hsGCα1/β1 mitsamt dem anhängenden GST-Tag von der Glutathion-Sepharose 4B abgelöst. Nach Zentrifugation bei 500 x g für 5 min wurde der Überstand mit darin gelöstem GST-hsGCα1/β1 abgenommen.

10

5

- 15 Durch die Elution mit Thrombin ergibt sich mit einem einzigen, affinitätschromatografischen Schritt eine doppelte Selektivität:
 - 1.) Es binden nur Proteine, die eine Affinität zu reduziertem Glutathion zeigen.
 - 2.) Von diesen Proteinen werden nur diese (als Spaltprodukte) eluiert, die von Thrombin gespalten werden.



20

Die Abtrennung des Thrombins kann über eine p-Aminobenzamidinsäule erfolgen, an die das Thrombin spezifisch bindet.

Abb. 12 zeigt im Vergleich zum Lysat der infizierten Sf9-Zellen die spezifische
25 Anreicherung der sGC-Aktivität nach Elution von der GSH-Sepharose 4B mit
Glutathion.

Abb. 14 zeigt im Immunoblot die Bindung von GST-hsGCα1 an Glutathion-Sepharose 4B und die Abspaltung des hsGCα1 vom GST-Tag durch Thrombin.

Abb. 15 zeigt im mit Coomassie-Brilliant-Blue-R250 gefärbten SDS-Polyacrylamid-Gel den Nachweis der Reinigung von koexprimierter $hsGC\alpha 1$ mit GST-Tag und hsGCB1 ohne GST-Tag durch Affinitätschromatographie an Glutathion-Sepharose 4B. Bei Elution mit reduziertem Glutathion waren nur zwei Banden zu erkennen, die GST-hsGCa1 (größeres Produkt) und hsGCB1 (kleineres Produkt) entsprechen (nachgewiesen im Immunoblot). Wurde dagegen mit Thrombin eluiert (0,25 oder 0,5 oder 1 Einheit/ml für 3 Stunden bei Raumtemperatur), so war die untere Bande identisch (hsGCβ1; Molekulargewicht wurde nach Laufverhalten geschätzt auf ca. 70 kDa), die obere Bande war im Vergleich zur Elution mit Glutathion deutlich kleiner (hsGCa1; Molekulargewicht wurde geschätzt auf ca. 80 kDa), da bei der Thrombinelution der GST-Tag abgespalten wird. Dies entspricht in etwa den aufgrund der abgeleiteten Aminosäuresequenz vorhergesagten Molekulargewichten von 77,5 kDa für hsGCα1 und 70,5 kDa für hsGCβ1. Bei der Elution durch Thrombin war anders als bei der Elution durch reduziertes Glutathion noch eine sehr kleine Bande von etwa 25 kDa zu erkennen, die Thrombin selbst darstellen dürfte. Das Thrombin kann aus dem Eluat durch eine p-Aminobenzamidin-Sepharose-Säule entfernt werden, an die Thrombin spezifisch bindet. Andere Banden waren bei dem Versuch nicht erkennbar.

20

25

30

15

10

Beispiel 8

Herstellung von polyklonalen Kaninchen-Antiseren gegen hs $GC\alpha 1$ und hs $GC\beta 1$.

Antiseren wurden gewonnen durch Immunisierung von Kaninchen gegen synthetische Peptide, die der hsGCα1 (Phe-Thr-Pro-Arg-Ser-Arg-Glu-Glu-Leu-Pro-Pro-Asn-Phe-Pro (Abb. 22/SEQ IN NO: 5); Aminosäuren 634-647) bzw. der hsGCβ1 (Lys-Gly-Lys-Lys-Glu-Pro-Met-Gln-Val-Trp-Phe-Leu-Ser-Arg-Lys-Asn-Thr-Gly-Thr-Glu-Glu-Thr (Abb. 23/SEQ ID NO: 6); Aminosäuren 593-614) entsprechen, und die an KLH (Keyhole limpet hemocyanin) über einen zusätzlichen C-terminalen (α1) oder N-terminalen (β1) Cysteinrest gekoppelt wurden. Die Antiseren wurden

affinitätsgereinigt mit den jeweiligen Peptiden, die an Epoxy-aktivierte Sepharose (Pharmacia, Freiburg) gekoppelt wurden (nach Anleitung des Herstellers).

Beispiel 9

Nachweis der $hSGC\alpha 1$ und $hsGC\beta 1$ in verschiedenen humanen Geweben im Immunoblot.

Humanes Lungengewebe wurde von einem tumorfreien Bereich einer Lungenresektion bezogen, humanes Cortex und Cerebellum von einer normalen Autopsie. Alle Gewebe waren sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -70°C gelagert worden. Die gefrorenen Gewebe wurden gemörsert und das Pulver in 2 x konzentriertem, vorerhitztem SDS-Stopp-Puffer (130 mM Tris-HCl pH 6,8 / 16 % [v/v] Glycerin / 4 % [w/v] SDS / 0,025 % [w/v] Bromphenolblau / 6,5 % [v/v] \(\mathcal{G} \)-Mercaptoethanol) aufgenommen, 10 min bei 95°C inkubiert und dann 20 min bei 20000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde im Immunoblot eingesetzt (Antikörper siehe oben).

In allen drei Geweben kann eine Expression beider Untereinheiten (α1 und β1) nachgewiesen werden (Abb. 13). Keine Expression konnte dagegen in Niere, Leber und Pankreas gezeigt werden (Daten nicht gezeigt).



20

5

10

15

Beispiel 10

Konstruktion von rekombinanten adenoviralen lisGC-Vektoren

25

30

Die cDNAs für die hsGCα1 und hsGCβ1 wurden mit dem Restriktionsenzym EcoRI als Fragmente von 3,0 kb (hsGCα1) bzw. 2,4 kb (hsGCβ3) aus dem Originalplasmid herausgeschnitten. Diese Fragmente wurden jeweils in die EcoRI-Schnittstellen des adenoviralen Transferplasmids pZS2 inseriert (Abb. 16), das eine Adenovirus-Typ-5-Sequenz (Ad5) mit einer Deletion in der E1-Region (ΔE1) enthält, gefolgt von einer Expressionskassette mit CMV- (Cytomegalovirus) Promotor/-Enhancer und einer in

diesem Plasmid einmaligen XbaI-Restriktions-Schnittstelle. XbaI-geschnittenes $hsGC\alpha 1-pZS2\ und\ hsGC\beta 1-pZS2\ wurde\ in\ die Xba I-Schnittstelle\ des\ langen\ Armes$ (RR5) von Ad5 inseriert (Abb. 16). Dies ergab die Adenovektoren Ad5CMVhsGClpha1 bzw. Ad5CMVhsGC\u03b31. Die resultierenden rekombinanten Adenovirusvektoren sind replikationsdefizient, da ihnen der E1-Bereich fehlt. Zur Vermehrung der Viren wurden 293-Zellen, die E1 exprimieren, mit diesen Viren infiziert. Virale Plaques erschienen 12 bis 24 Stunden nach der Transfektion, und Viren aus Einzelplaques wurden nach einem Standardprotokoll aufgereinigt. Plaques, die rekombinantes Virus enthalten (Ad5CMVhsGCα1 oder Ad5CMVhsGCβ1) wurden durch PCR-Analyse identifiziert: Das Plaque-Material wurde dreimal eingefroren und aufgetaut, bei 37°C für 30 min in Lysepuffer (16,6 mM Ammoniumsulfat / 67 mM Tris-HCl pH 6,8 / 6,7 mM MgCl $_2$ / 5 mM ß-Mercaptoethanol / 6,7 mM EDTA / 1,7 mM SDS / 50 μg/ml Proteinase K) inkubiert, und dann für 10 min bei 85°C Schließlich wurde die DNA mit einer hitzeinaktiviert. Phenol/Chloroform-Extraktion aus dem Lysat isoliert und einer PCR-Analyse unterzogen.

5

10

15

20

25

30

Beispiel 11

Nachweis der cGMP-Bildung in EA.hy926-Zellen nach Koinfektion mit den hsGC-Adenovektoren Ad5CMVhsGCα1 und Ad5CMVhsGCβ1

Zehn 10-cm-Platten mit "EA.hy926"-Zellen wurden mit je 2 x 10¹0 pfu (Plaquebildende Einheiten) pro Platte koinfiziert. Die Ernte erfolgte nach ca. 72 Stunden durch Zugabe von hypotonem Lysepuffer (25 mM Triethanolamin pH 7,8 / 1 mM EDTA / 5 mM DTT / 1 μ M Leupeptin / 0,5 mg/l Trypsin-Inhibitor / 0,2 mM PMSF) und Ablösen mit einem Gummischaber. Das Homogenat wurde für 15 min bei 500 x g zentrifugiert und der Überstand mit einem gleichen Volumen Glycerin vermischt und bei -20°C gelagert. Die hsGC-Stimulierbarkeit durch 100 μ M SNP (Nitroprussidnatrium) wurde ermittelt durch Messung der cGMP-Konzentration und des cGMP-Gehaltes basal und nach SNP-Stimulation wie oben beschrieben

[siehe Beispiel 5]. In drei Ansätzen (A, B, C) war im Vergleich zur Basalaktivität eine 7fache bis 10,75fach erhöhte cGMP-Konzentration nach SNP-Stimulation nachweisbar, während in der Kontrolle ohne Adenovirusinfektion keine signifikante Erhöhung zu messen war (Abb. 17).

Literatur:

20

25

Bradford, M.M. (1976) Annal. Biochem. 72: 248-254.

5 Friebe, A.; Schultz, G.; Koesling, D. (1996) *EMBO J.* **15**: 6863-6868.

Garthwaite, J.; Southam, E.; Boulton, C. L.; Nielsen, E. B.; Schmidt, K.; Mayer, B. (1995) Mol. Pharmacol. 48: 184-188.

10 Giuili, G.; Scholl, U.; Bulle, F.; Guellaen, G. (1992) FEBS Lett. 304: 83-88.

Guthmann, F.; Mayer, B.; Koesling, D.; Kukovetz, W.R.; Boehme, E. (1992) Naunyu-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 346: 537-541.

Harteneck, C.; Wedel, B.; Koesling, D.; Malkewitz, J.; Böhme, E.; Schultz, G. (1991) FEBS Lett. 292: 217-222.

Humbert, P.; Niroomand, F.; Fischer, G.; Mayer, B.; Koesling, D.; Hinsch, K.-D.; Gausepohl, H.; Frank, R.; Schultz, G.; Böhme, E. (1990) Eur. J. Biochem. 190: 273-278.

Ko, F. N.; Wu, C. C.; Kuo, S.-C.; Lee, F.-Y.; Teng, C.M. (1994) Blood 84: 4226-4233.

Koesling, D.; Herz, J.; Gausepohl, H.; Niroomand, F.; Hinsch, K.-D.; Mülsch, A.; Böhme, E.; Schultz, G.; Frank, R. (1988) FEBS Lett. 239: 29-34.

Schmidt, H. H. H. W.; Walter, U. (1994) Cell 78: 919-925.

Schultz, G.; Böhme, E. (1984) erschienen in: Bergmeyer, H. U.; Bergmeyer, J.; Graßl, M. (Hrsg.): Methods of Enzymatic Analysis, Vol. 4, Verlag Chemie, Weinheim, Seiten 379-389.

Wu, C.-C.; Ko, F.-N.; Kuo, S.-C.; Lee, F.-Y.; Teng, C.-M. (1995) British J. Pharmacol. 116: 1973-1978.

SEQUENZPROTOKOLL

(1) ALLGEMEINE ANGABEN:

- (i) ANMELDER:
 - (A) NAME: Vasopharm Biotech GmbH & Co. KG
 - (B) STRASSE: Leichtackerstr. 6
 - (C) ORT: Veitshöchheim
 - (D) BUNDESLAND: Bayern
 - (E) LAND: Deutschland
 - (F) POSTLEITZAHL: 97209
 - (G) TELEFON:
- (ii) BEZEICHNUNG DER ERFINDUNG: Isolierte und gereinigte humane lösliche Guanylylcyclase $\alpha 1/\beta 1$ (hsGC $\alpha 1/\beta 1$)
 - (iii) ANZAHL DER SEQUENZEN: 10
 - (iv) COMPUTER-LESBARE FASSUNG:
 - (A) DATENTRÄGER: Floppy disk
 - (B) COMPUTER: IBM PC compatible
 - (C) BETRIEBSSYSTEM: PC-DOS/MS-DOS
 - (D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version #1.30 (EPA)
- (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 1:
 - (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 - (A) LÄNGE: 3015 Basenpaare
 - (B) ART: Nucleotid
 - (C) STRANGFORM: Doppelstrang
 - (D) TOPOLOGIE: linear
 - (ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA
 - (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:1:

CCCTTATGGC GATTGGGCG	G CTGCAGAGAC	CAGGACTCAG	TTCCCCTGCC	CTAGTCTGAG	60
CCTAGTGGGT GGGACTCAG	C TCAGAGTCAG	TTTTCCAGAA	GCAGGTTTCA	GTGCAGAGTT	120
TTCCTACACT TTTCCTGCG	C TAGAGCAGCG	AGCAGCCTGG	AACAGACCCA	GGCGGAGGAC	180
ACCTGTGGGG GAGGGAGCG	C CTGGAGGAGC	TTAGAGACCC	CAGCCGGGCG	TGATCTCACC	240
ATGTGCGGAT TTGCGAGGC	G CGCCCTGGAG	CTGCTAGAGA	TCCGGAAGCA	CAGCCCCGAG	300
GTGTGCGAAG CCACCAAGA	C TGCGGCTCTT	GGAGAAAGCG	TGAGCAGGGG	GCCACCGCGG	360
TCTCCGCGCC TGTCTGCAC	C CTGTCGCCTG	AGCTGCCTGA	CAGTGACAAT	GACATCCCAG	420
TTACCAGTGT CCTTGAATT	G ATAGTGGCTT	CTGTTTGTCA	GTCTCATATA	AGAACTACAG	480
CTCATCAGGA GGAGATCGC	A GCAGGGTAAG	AGACACCAAC	ACCATGTTCT	GCACGAAGCT	540
CAAGGATCTC AAGATCACA	G GAGAGTGTCC	TTTCTCCTTA	CTGGCACCAG	GTCAAGTTCC	600
TAACGAGTCT TCAGAGGAG	G CAGCAGGAAG	CTCAGAGAGC	TGCAAAGCAA	CCGTGCCCAT	660
CTGTCAAGAC ATTCCTGAG	A AGAACATACA	AGAAAGTCTT	CCTCAAAGAA	AAACCAGTCG	720
GAGCCGAGTC TATCTTCAC	A CTTTGGCAGA	GAGTATTTGC	AAACTGATTT	TCCCAGAGTT	780
TGAACGGCTG AATGTTGCA	C TTCAGAGAAC	ATTGGCAAAG	CACAAAATAA	AAGAAAGCAG	840
GAAATCTTTG GAAAGAGAA	G ACTTTGAAAA	AACAATTGCA	GAGCAAGCAG	TTGCAGCAGG	900
AGTTCCAGTG GAGGTTATC	A AAGAATCTCT	TGGTGAAGAG	GTTTTTAAAA	TATGTTACGA	960
GGAAGATGAA AACATCCTI	G GGGTGGTTGG	AGGCACCCTT	AAAGATTTTT	TAAACAGCTT	1020
CAGTACCCTT CTGAAACAG	A GCAGCCATTG	CCAAGAAGCA	GGAAAAAGGG	GCAGGCTTGA	1080

					•	
GGACGCCTCC	ATT TGCC	TGGATAAGGA	GGATGATTTT	CT/ GTTT	ACTACTTCTT	1140
CCCTAAGAGA	ACCACCTCCC	TGATTCTTCC	CGGCATCATA	AAGGCAGCTG	CTCACGTATT	1200
ATATGAAACG	GAAGTGGAAG	TGTCGTTAAT	GCCTCCCTGC	TTCCATAATG	ATTGCAGCGA	1260
GTTTGTGAAT	CAGCCCTACT	TGTTGTACTC	CGTTCACATG	AAAAGCACCA	AGCCATCCCT	1320
GTCCCCCAGC	AAACCCCAGT	CCTCGCTGGT	GATTCCCACA	TCGCTATTCT	GCAAGACATT	1380
TCCATTCCAT	TTCATGTTTG	ACAAAGATAT	GACAATTCTG	CAATTTGGCA	ATGGCATCAG	1440
AAGGCTGATG	AACAGGAGAG	ACTTTCAAGG	AAAGCCTAAT	TTTGAAGAAT	ACTTTGAAAT	1500
TCTGACTCCA	AAAATCAACC	AGACGTTTAG	CGGGATCATG	ACTATGTTGA	ATATGCAGTT	1560
TGTTGTACGA	GTGAGGAGAT	GGGACAACTC	TGTGAAGAAA	TCTTCAAGGG	TTATGGACCT	1620
CAAAGGCCAA	ATGATCTACA	TTGTTGAATC	CAGTGCAATC	TTGTTTTTGG	GGTCACCCTG	1680
TGTGGACAGA	TTAGAAGATT	TTACAGGACG	AGGGCTCTAC	CTCTCAGACA	TCCCAATTCA	1740
CAATGCACTG	AGGGATGTGG	TCTTAATAGG	GGAACAAGCC	CGAGCTCAAG	ATGGCCTGAA	1800
GAAGAGGCTG	GGGAAGCTGA	AGGCTACCCT	TGAGCAAGCC	CACCAAGCCC	TGGAGGAGGA	1860
GAAGAAAAAG	ACAGTAGACC	TTCTGTGCTC	CATATTTCCC	TGTGAGGTTG	CTCAGCAGCT	1920
GTGGCAAGGG	CAAGTTGTGC	AAGCCAAGAA	GTTCAGTAAT	GTCACCATGC	TCTTCTCAGA	1980
CATCGTTGGG	TTCACTGCCA	TCTGCTCCCA	GTGCTCACCG	CTGCAGGTCA	TCACCATGCT	2040
CAATGCACTG	TACACTCGCT	TCGACCAGCA	GTGTGGAGAG	CTGGATGTCT	ACAAGGTGGA	2100
GACCATTGGC	GATGCCTATT	GTGTAGCTGG	GGGATTACAC	AAAGAGAGTG	ATACTCATGC	2160
TGTTCAGATA	GCGCTGATGG	CCCTGAAGAT	GATGGAGCTC	TCTGATGAAG	TTATGTCTCC	2220
CCATGGAGAA	CCTATCAAGA	TGCGAATTGG	ACTGCACTCT	GGATCAGTTT	TTGCTGGCGT	2280
CGTTGGAGTT	AAAATGCCCC	GTTACTGTCT	TTTTGGAAAC	AATGTCACTC	TGGCTAACAA	2340
ATTTGAGTCC	TGCAGTGTAC	CACGAAAAAT	CAATGTCAGC	CCAACAACTT	ACAGATTACT	2400
CAAAGACTGT	CCTGGTTTCG	TGTTTACCCC	TCGATCAAGG	GAGGAACTTC	CACCAAACTT	2460
CCCTAGTGAA	ATCCCCGGAA	TCTGCCATTT	TCTGGATGCT	TACCAACAAG	GAACAAACTC	2520
AAAACCATGC	TTCCAAAAGA	AAGATGTGGA	AGATGGCAAT	GCCAATTTTT	TAGGCAAAGC	2580
ATCAGGAATA	GATTAGCAAC	CTATATACCT	ATTTATAAGT	CTTTGGGGTT	TGACTCATTG	2640
AAGATGTGTA	GAGCCTCTGA	AAGCACTTTA	GGGATTGTAG	ATGGCTAACA		2700
AAATTTCAGG		CAATCTTTCT			GTACTCACTT	2760
CAGTACTTCA	GCTCTTCAAG	AAAAAAAAA	. AAACCTTAAA	AAGCTACTTT	TGTGGGAGTA	2820
TTTCTATTAT			-		TGTACATATA	2880
TCAGATAATT		GTACAAACTG				2940
GGAATGCCAT	GGTTATTAAA	. GTGTGTTTGT	GATAGTGTCG	TCAAAAAAAA	AAAAAAAAA	3000
AAAAAAAAA	AAAAA			1		3015

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 2:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 695 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKUELS: Protein (humanen löslichen Guanylylcyclase al (hsGCal))

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 2:

 Met
 Phe
 Cys
 Thr
 Lys
 Leu
 Lys
 Asp
 Leu
 Lys
 Ile
 Thr
 Gly
 Glu
 Cys
 Pro

 Phe
 Ser
 Leu
 Ala
 Pro
 Gly
 Gly
 Pro
 Asn
 Glu
 Ser
 Ser
 Glu
 Glu

Leu Ile Phe Pro Glu Phe Glu Arg Leu Asn Val Ala Leu Gln Arg Thr Leu Ala Lys His Lys Ile Lys Glu Ser Arg Lys Ser Leu Glu Arg Glu Asp Phe Glu Lys Thr Ile Ala Glu Gln Ala Val Ala Ala Gly Val Pro Val Glu Val Ile Lys Glu Ser Leu Gly Glu Glu Val Phe Lys Ile Cys Tyr Glu Glu Asp Glu Asn Ile Leu Gly Val Val Gly Gly Thr Leu Lys Asp Phe Leu Asn Ser Phe Ser Thr Leu Leu Lys Gln Ser Ser His Cys Gln Glu Ala Gly Lys Arg Gly Arg Leu Glu Asp Ala Ser Ile Leu Cys Leu Asp Lys Glu Asp Asp Phe Leu His Val Tyr Tyr Phe Phe Pro Lys Arg Thr Thr Ser Leu Ile Leu Pro Gly Ile Ile Lys Ala Ala Ala His Val Leu Tyr Glu Thr Glu Val Glu Val Ser Leu Met Pro Pro Cys Phe His Asn Asp Cys Ser Glu Phe Val Asn Gln Pro Tyr Leu Leu Tyr Ser Val His Met Lys Ser Thr Lys Pro Ser Leu Ser Pro Ser Lys Pro Gln Ser Ser Leu Val Ile Pro Thr Ser Leu Phe Cys Lys Thr Phe Pro Phe His Phe Met Phe Asp Lys Asp Met Thr Ile Leu Gln Phe Gly Asn Gly Ile Arg Arg Leu Met Asn Arg Arg Asp Phe Gln Gly Lys Pro Asn Phe Glu Glu Tyr Phe Glu Ile Leu Thr Pro Lys Ile Asn Gln Thr Phe Ser Gly Ile Met Thr Met Leu Asn Met Gln Phe Val Val Arg Val Arg Arg Trp Asp Asn Ser Val Lys Lys Ser Ser Arg Val Met Asp Leu Lys Gly Gln Met Ile Tyr Ile Val Glu Ser Ser Ala Ile Leu Phe Leu Gly Ser Pro Cys Val Asp Arg Leu Glu Asp Phe Thr Gly Arg Gly Leu Tyr Leu Ser Asp Ile Pro Ile His Asn Ala Leu Arg Asp Val Val Leu Ile Gly Glu Gln Ala Arg Ala Gln Asp Gly Leu Lys Lys Arg Leu Gly Lys Leu Lys Ala Thr Leu Glu Gln Ala His Gln Ala Leu Glu Glu Glu Lys Lys Lys Thr Val Asp Leu Leu Cys Ser Ile Phe Pro Cys Glu Val Ala Gln Gln Leu Trp Gln Gly Gln Val Val Gln Ala Lys Lys Phe Ser Asn Val Thr Met Leu Phe Ser Asp Ile Val Gly Phe Thr Ala Ile Cys Ser Gln Cys Ser Pro Leu Gln Val Ile Thr Met Leu Asn Ala Leu Tyr Thr Arg Phe Asp Gln Gln Cys Gly Glu Leu Asp Val Tyr Lys Val Glu Thr Ile Gly Asp Ala Tyr Cys Val Ala Gly Gly Leu His Lys Glu Ser Asp Thr His Ala Val Gln Ile Ala Leu Met Ala Leu Lys Met Met Glu Leu Ser

560 555 Asp Glu Val Met Ser Pro His Gly Glu Pro Ile Lys Met Arg Ile Gly 570 575 Leu His Ser Gly Ser Val Phe Ala Gly Val Val Gly Val Lys Met Pro 590 595 Arg Tyr Cys Leu Phe Gly Asn Asn Val Thr Leu Ala Asn Lys Phe Glu 605 Ser Cys Ser Val Pro Arg Lys Ile Asn Val Ser Pro Thr Thr Tyr Arg 615 620 625 Leu Leu Lys Asp Cys Pro Gly Phe Val Phe Thr Pro Arg Ser Arg Glu 635 640 645 Glu Leu Pro Pro Asn Phe Pro Ser Glu Ile Pro Gly Ile Cys His Phe 655 650 Leu Asp Ala Tyr Gln Gln Gly Thr Asn Ser Lys Pro Cys Phe Gln Lys 665 670 Lys Asp Val Glu Asp Gly Asn Ala Asn Phe Leu Gly Lys Ala Ser Gly 685 Ile Asp 695



(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 3:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 2443 Basenpaare

(B) ART: Nucleotid

(C) STRANGFORM: Doppelstrang

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:3:

CCCCCCCCG CCGCTGCCGC CTCTGCCTGG GTCCCTTCGG CCGTACCTCT GCGTGGGGGC TGCCTCCCG GCTCCCGGTG CAGACACCAT GTACGGATTT GTGAATCACG CCCTGGAGTT 120 GCTGGTGATC CGCAATTACG GCCCCGAGGT GTGGGAAGAC ATCAAAAAAG AGGCACAGTT 180 AGATGAAGAA GGACAGTTTC TTGTCAGAAT AATATATGAT GACTCCAAAA CTTATGATTT GGTTGCTGCT GCAAGCAAAG TCCTCAATCT CAATGCTGGA GAAATCCTCC AAATGTTTGG GAAGATGTTT TTCGTCTTTT GCCAAGAATC TGGTTATGAT ACAATCTTGC GTGTCCTGGG CTCTAATGTC AGAGAATTTC TACAGAACCT TGATGCTCTG CACGACCACC TTGCTACCAT 420 CTACCCAGGA ATGCGTGCAC CTTCCTTTAG GTGCACTGAT GCAGAAAAGG GCAAAGGACT 480 CATTTTGCAC TACTACTCAG AGAGAGAAGG ACTTCAGGAT ATTGTCATTG GAATCATCAA 540 AACAGTGGCA CAACAAATCC ATGGCACTGA AATAGACATG AAGGTTATTC AGCAAAGAAA 600 TGAAGAATGT GATCATACTC AATTTTTAAT TGAAGAAAAA GAGTCAAAAG AAGAGGATTT TTATGAAGAT CTTGACAGAT TTGAAGAAAA TGGTACCCAG GAATCACGCA TCAGCCCATA TACATTCTGC AAAGCTTTTC CTTTTCATAT AATATTTGAC CGGGACCTAG TGGTCACTCA 780 GTGTGGCAAT GCTATATACA GAGTTCTCCC CCAGCTCCAG CCTGGGAATT GCAGCCTTCT 840 GTCTGTCTTC TCGCTGGTTC GTCCTCATAT TGATATTAGT TTCCATGGGA TCCTTTCTCA 900 CATCAATACT GTTTTGTAT TGAGAAGCAA GGAAGGATTG TTGGATGTGG AGAAATTAGA 960 ATGTGAGGAT GAACTGACTG GGACTGAGAT CAGCTGCTTA CGTCTCAAGG GTCAAATGAT 1020 CTACTTACCT GAAGCAGATA GCATACTTTT TCTATGTTCA CCAAGTGTCA TGAACCTGGA 1080 CGATTTGACA AGGAGAGGGC TGTATCTAAG TGACATCCCT CTGCATGATG CCACGCGCGA 1140 TCTTGTTCTT TTGGGAGAAC AATTTAGAGA GGAATACAAA CTCACCCAAG AACTGGAAAT 1200 CCTCACTGAC AGGCTACAGC TCACGTTAAG AGCCCTGGAA GATGAAAAGA AAAAGACAGA 1260 CACATTGCTG TATTCTGTCC TTCCTCCGTC TGTTGCCAAT GAGCTGCGGC ACAAGCGTCC 1320 AGTGCCTGCC AAAAGATATG ACAATGTGAC CATCCTCTTT AGTGGCATTG TGGGCTTCAA TGCTTTCTGT AGCAAGCATG CATCTGGAGA AGGAGCCATG AAGATCGTCA ACCTCCTCAA 1440 CGACCTCTAC ACCAGATTTG ACACACTGAC TGATTCCCGG AAAAACCCAT TTGTTTATAA 1500

·			39 ·	• •		• • • • •	W
GGTGGAGACT	GTTGGTGACA	AGTATATGAC	AGTGAGTGGT	TTACCAGAGC	CATGCATTCA	1560	
CCATGCACGA	TCCATCTGCC	ACCTGGCCTT	GGACATGATG	GAAATTGCTG	GCCAGGTTCA	1620	
AGTAGATGGT	GAATCTGTTC	AGATAACAAT	AGGGATACAC	ACTGGAGAGG	TAGTTACAGG	1680	
TGTCATAGGA	CAGCGGATGC	CTCGATACTG	TCTTTTTGGG	AATACTGTCA	ACCTCACAAG	1740	
CCGAACAGAA	ACCACAGGAG	AAAAGGGAAA	AATAAATGTG	TCTGAATATA	CATACAGATG	1800	
TCTTATGTCT	CCAGAAAATT	CAGATCCACA	ATTCCACTTG	GAGCACAGAG	GCCCAGTGTC	1860	
CATGAAGGGC	AAAAAAGAAC	CAATGCAAGT	TTGGTTTCTA	TCCAGAAAAA	ATACAGGAAC	1920	
AGAGGAAACA	AAGCAGGATG	ATGACTGAAT	CTTGGATTAT	GGGGTGAAGA	GGAGTACAGA	1980	
CTAGGTTCCA	GTTTTCTCCT	AACACGTGCC	AAGCCCAGGA	GCAGTTCTTC	CCTATGGATA	2040	
CAGATTTTCT	TTTGTCCTTG	TCCATTACCC	CAAGACTTTC	TTCTAGATAT	ATCTCTCACT	2100	
ATCCGTTATT	CAACCTTAGC	TCTGCTTTCT	ATTACTTTTT	AGGCTTTAGT	ATATTATCTA	2160	
AAGTTTGGCT	TTTGATGTGG	ATGATGTGAG	CTTCATGTGT	CTTAAAATCT	ACTACAAGCA	2220	
TTACCTAACA	TGGTGATCTG	CAAGTAGTAG	GCACCCAATA	AATATTTGTT	GAATTTAGTT	2280	
AAATGAAACT	GAACAGTGTT	TGGCCATGTG	TATATTTATA	TCATGTTTAC	CAAATCTGTT	2340	
TAGTGTTCCA	CATATATGTA	TATGTATATT	TTAATGACTA	TAATGTAATA	AAGTTTATAT	2400	
CATGTTGGTG	TATATCATTA	TAGAAATCAT	TTTCTAAAGG	AGT		2443	

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 4 .:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 619 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKUELS: Protein (humanen löslichen Guanylylcyclase bl (hsGCb1))

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 4:

Met Tyr Gly Phe Val Asn His Ala Leu Glu Leu Leu Val Ile Arg Asn Tyr Gly Pro Glu Val Trp Glu Asp Ile Lys Lys Glu Ala Gln Leu Asp 25 Glu Glu Gly Gln Phe Leu Val Arg Ile Ile Tyr Asp Asp Ser Lys Thr 40 Tyr Asp Leu Val Ala Ala Ala Ser Lys Val Leu Asn Leu Asn Ala Gly 55 60 Glu Ile Leu Gln Met Phe Gly Lys Met Phe Phe Val Phe Cys Gln Glu 70 Ser Gly Tyr Asp Thr Ile Leu Arg Val Leu Gly Ser Asn Val Arg Glu 85 90 Phe Leu Gln Asn Leu Asp Ala Leu His Asp His Leu Ala Thr Ile Tyr 105 Pro Gly Met Arg Ala Pro Ser Phe Arg Cys Thr Asp Ala Glu Lys Gly 120 Lys Gly Leu Ile Leu His Tyr Tyr Ser Glu Arg Glu Gly Leu Gln Asp 135 140 Ile Val Ile Gly Ile Ile Lys Thr Val Ala Gln Gln Ile His Gly Thr 150 155 Glu Ile Asp Met Lys Val Ile Gln Gln Arg Asn Glu Glu Cys Asp His 165 170 Thr Gln Phe Leu Ile Glu Glu Lys Glu Ser Lys Glu Glu Asp Phe Tyr 185 Glu Asp Leu Asp Arg Phe Glu Glu Asn Gly Thr Gln Glu Ser Arg Ile 200 Ser Pro Tyr Thr Phe Cys Lys Ala Phe Pro Phe His Ile Ile Phe Asp

Arg Asp Leu Var Val Thr Gln Cys Gly Asn Ala Ile Tyr Arg Val Leu 230 235 Pro Gln Leu Gln Pro Gly Asn Cys Ser Leu Leu Ser Val Phe Ser Leu 245 250 Val Arg Pro His Ile Asp Ile Ser Phe His Gly Ile Leu Ser His Ile 260 265 Asn Thr Val Phe Val Leu Arg Ser Lys Glu Gly Leu Leu Asp Val Glu 280 Lys Leu Glu Cys Glu Asp Glu Leu Thr Gly Thr Glu Ile Ser Cys Leu 295 300 Arg Leu Lys Gly Gln Met Ile Tyr Leu Pro Glu Ala Asp Ser Ile Leu 310 315 Phe Leu Cys Ser Pro Ser Val Met Asn Leu Asp Asp Leu Thr Arg Arg 330 Gly Leu Tyr Leu Ser Asp Ile Pro Leu His Asp Ala Thr Arg Asp Leu 340 345 Val Leu Leu Gly Glu Gln Phe Arg Glu Glu Tyr Lys Leu Thr Gln Glu 360 Leu Glu Ile Leu Thr Asp Arg Leu Gln Leu Thr Leu Arg Ala Leu Glu 375 Asp Glu Lys Lys Lys Thr Asp Thr Leu Leu Tyr Ser Val Leu Pro Pro 390 395 Ser Val Ala Asn Glu Leu Arg His Lys Arg Pro Val Pro Ala Lys Arg 405 410 Tyr Asp Asn Val Thr Ile Leu Phe Ser Gly Ile Val Gly Phe Asn Ala 420 , 425 Phe Cys Ser Lys His Ala Ser Gly Glu Gly Ala Met Lys Ile Val Asn 440 Leu Leu Asn Asp Leu Tyr Thr Arg Phe Asp Thr Leu Thr Asp Ser Arg 455 460 Lys Asn Pro Phe Val Tyr Lys Val Glu Thr Val Gly Asp Lys Tyr Met 470 475 Thr Val Ser Gly Leu Pro Glu Pro Cys Ile His His Ala Arg Ser Ile 490 Cys His Leu Ala Leu Asp Met Met Glu Ile Ala Gly Gln Val Gln Val 505 Asp Gly Glu Ser Val Gln Ile Thr Ile Gly Ile His Thr Gly Glu Val 520 525 Val Thr Gly Val Ile Gly Gln Arg Met Pro Arg Tyr Cys Leu Phe Gly 535 540 Asn Thr Val Asn Leu Thr Ser Arg Thr Glu Thr Thr Gly Glu Lys Gly 550 555 Lys Ile Asn Val Ser Glu Tyr Thr Tyr Arg Cys Leu Met Ser Pro Glu 565 570 Asn Ser Asp Pro Gln Phe His Leu Glu His Arg Gly Pro Val Ser Met 580 585 Lys Gly Lys Lys Glu Pro Met Gln Val Trp Phe Leu Ser Arg Lys Asn 600 Thr Gly Thr Glu Glu Thr Lys Gln Asp Asp 610 615

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 5:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 14 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (D) TOPOLOGIE: linear

- (ii) ART DES MOLEKUELS: Peptid (Aminosäuren 634-647 der hsGCal)
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 5:

Phe Thr Pro Arg Ser Arg Glu Glu Leu Pro Pro Asn Phe Pro 5

- (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 6:
 - (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 - (A) LÄNGE: 22 Aminosäuren
 - (B) ART: Aminosäure
 - (D) TOPOLOGIE: linear
 - (ii) ART DES MOLEKUELS: Peptid (Aminosäuren 593-614 der hsGCb1)
 - (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 6:

Lys Gly Lys Lys Glu Pro Met Gln Val Trp Phe Leu Ser Arg Lys Asn
5 10 15

Thr Gly Thr Glu Glu Thr
20



- (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 7:
 - (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 - (A) LÄNGE: 28 Basenpaare
 - (B) ART: Nucleotid
 - (C) STRANGFORM: Einzelstrang
 - (D) TOPOLOGIE: linear
 - (ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA
 - (iii) HYPOTHETISCH: Nein
 - (iv) ANTISENSE: Nein
 - (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:7:



AAAAGGATCC ATGTTCTGCA CGAAGCTC

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 8:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 - (A) LÄNGE: 18 Basenpaare
 - (B) ART: Nucleotid
 - (C) STRANGFORM: Einzelstrang
 - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA
- (iii) HYPOTHETISCH: Nein
- (iv) ANTISENSE: Nein

28

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:8:

ATTATGGAAG CAGGGAGG	18
(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 9:	
(i) SEQUENZKENNZEICHEN: (A) LÄNGE: 28 Basenpaare (B) ART: Nucleotid (C) STRANGFORM: Einzelstrang (D) TOPOLOGIE: linear	
(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA	
(iii) HYPOTHETISCH: Nein	
(iv) ANTISENSE: Nein	
(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:9:	28
(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 10:	20
(i) SEQUENZKENNZEICHEN: (A) LÄNGE: 20 Basenpaare (B) ART: Nucleotid (C) STRANGFORM: Einzelstrang (D) TOPOLOGIE: linear	
(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA	
(iii) HYPOTHETISCH: Nein	
(iv) ANTISENSE: Nein	
(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:10:	
ATGCGTGATT CCTGGGTACC	20



Neue deutsche Patentanmeldung VASOPHARM BIOTECH GMBH & CO. KG Unser Zeichen: 197-2 14. August 1998 VO/MG/sti

5

PATENTANSPRÜCHE

1. Isolierte und zur apparenten Homogenität gereinigte humane lösliche Guanylylcyclase $\alpha 1/\beta 1$ (hsGC $\alpha 1/\beta 1$).



15

20

- 2. Verfahren zur Herstellung der Untereinheit $\alpha 1$ und/oder $\beta 1$ der humanen löslichen Guanylylcyclase, umfassend die Expression von die DNA-Sequenz für hsGC $\alpha 1$ und/oder hsGC $\beta 1$ enthaltenden Expressionsvektoren in prokaryontischen oder eukaryontischen Wirtszellen und Gewinnung der Untereinheit bzw. der Untereinheiten.
- 3. Verfahren zur Herstellung der Untereinheit α1 und/oder β1 der humanen löslichen Guanylylcyclase gemäß Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß der Schritt der Gewinnung der Untereinheit bzw. der Untereinheiten eine Lyse der Zellen, die Affinitätschromatographie des Zell-Lysats und die anschließende Elution der Untereinheit(en) umfaßt.
- 4. Verfahren zur Herstellung der Untereinheit α1 und/oder β1 der humanen löslichen Guanylylcyclase gemäß Anspruch 2 oder 3, dadurch gekennzeichnet, daß der Expressionsvektor zusätzlich mindestens eine DNA-Sequenz für eine Domäne zur spezifischen Affinitätschromatographie (Affinitätstag) mit anhängender Proteaseschnittstelle enthält.
- 5. Verfahren zur Herstellung der Untereinheit α1 und/oder β1 der humanen löslichen Guanylylcyclase gemäß Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß der

Expressionsvektor die DNA-Sequenz für hsGCα1 mit Affinitätstag, die DNA-Sequenz für hsGCβ1 mit Affinitätstag, die DNA-Sequenz für hsGCα1 mit Affinitätstag und die DNA-Sequenz für hsGCβ1, die DNA-Sequenz für hsGCβ1 mit Affinitätstag und die DNA-Sequenz für hsGCα1 oder die DNA-Sequenz für hsGCα1 mit Affinitätstag und die DNA-Sequenz für hsGCβ1 mit Affinitätstag enthält.

5

10

15

25

- 6. Verfahren zur Herstellung der humanen löslichen Guanylylcyclase $\alpha 1/\beta 1$ (hsGC $\alpha 1/\beta 1$), umfassend die getrennte Expression eines die DNA-Sequenz für hsGC $\alpha 1$ oder hsGC $\beta 1$ enthaltenden Expressionsvektors in prokaryontischen oder eukaryontischen Wirtszellen, Gewinnung der Untereinheiten und Kombinieren der Untereinheiten hsGC $\alpha 1$ und hsGC $\beta 1$ zur dimeren Guanylylcyclase $\alpha 1/\beta 1$ (hsGC $\alpha 1/\beta 1$).
- 7. Verfahren zur Herstellung der humanen löslichen Guanylylcyclase α1/β1 (hsGCα1/β1) gemäß Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, daß der Schritt der Gewinnung der Untereinheiten eine getrennte Lyse der hsGCα1 bzw. hsGCβ1 enthaltenden Zellen, die getrennte Affinitätschromatographie der Zell-Lysate und die anschließende Elution der Untereinheiten umfaßt.
- 8. Verfahren zur Herstellung der humanen löslichen Guanylylcyclase α1/β1 (hsGCα1/β1), umfassend die Koexpression der DNA-Sequenzen für hsGCα1 und hsGCβ1 in prokaryontischen oder eukaryontischen Wirtszellen, eine Lyse der hsGCα1 und hsGCβ1 enthaltenden Zellen, die Affinitätschromatographie und die anschließende Elution von hsGCα1/β1.

9. Verwendung einer Nukleinsäuresequenz, die die Untereinheit hsGC α 1 und/oder hsGC β 1 der humanen löslichen Guanylylcyclase α 1/ β 1 kodiert, für die somatische Gentherapie.

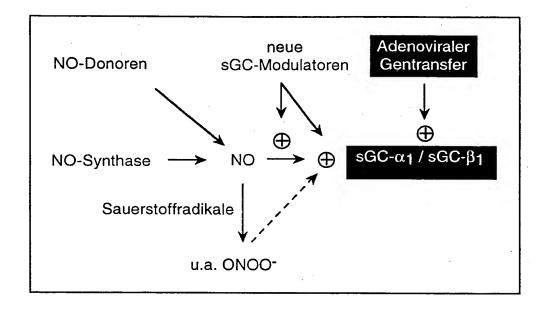
- 10. Verwendung nach Anspruch 9 zur Prävention und Therapie von Arteriosklerose und ihren Folgeerkrankungen, von Restenose, Ischämie (Infarkt), peripheren arteriellen Verschlußkrankheiten und arterieller Hypertonie sowie zur Prävention bei Patienten mit Risikofaktoren für Arteriosklerose.
- 11. Antikörper gegen humane lösliche Guanylylcyclase $\alpha 1/\beta 1$ (hsGC $\alpha 1/\beta 1$), erhältlich durch Immunisieren eines Säugers mit hsGC $\alpha 1/\beta 1$, der Untereinheit $\alpha 1$ oder $\beta 1$ oder immunogenen Peptidfragmenten davon und Isolieren der Antikörper.
- 12. Antikörper nach Anspruch 11, erhältlich durch Immunisieren eines Säugers mit dem Peptidfragment Phe-Thr-Pro-Arg-Ser-Arg-Glu-Glu-Leu-Pro-Pro-Asn-Phe-Pro oder Teilen hieraus oder hiermit überlappenden immunogenen Peptidfragmenten.

5

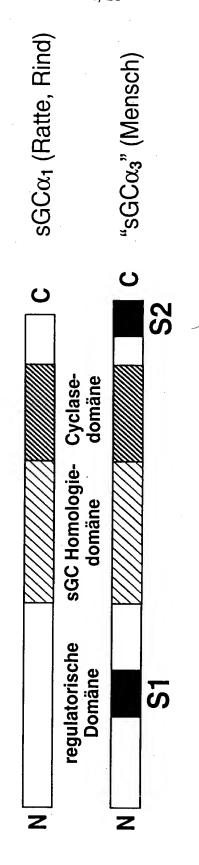
13. Antikörper nach Anspruch 11, erhältlich durch Immunisieren eines Säugers mit dem Peptidfragment Lys-Gly-Lys-Lys-Glu-Pro-Met-Gln-Val-Trp-Phe-Leu-Ser-Arg-Lys-Asn-Thr-Gly-Thr-Glu-Glu-Thr oder immunogenen Fragment oder hiermit überlappenden immunogenen Peptidfragmenten.

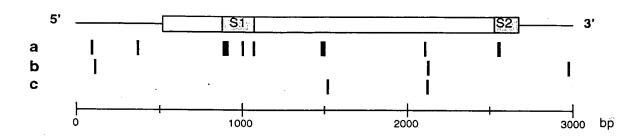
1/23

Abb. 1









a: Nukleotid-Insertionen

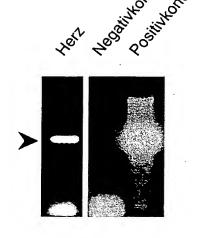
C95, C367, T891, G900, T903, G913, T1006, G1074, G1487, A1488, A1489, G2108, G2555, T2560

b: Nukleotid-Deletionen

T zwischen G111 und T112, T zwischen T2128 und G2129, T zwischen G2975 und T2976

c: Nukleotid-Austausche C1525 > G, G2125 > A

A PCR-Nachweis von hsGCα1



В

PCR-Nachweis von hsGCβ1

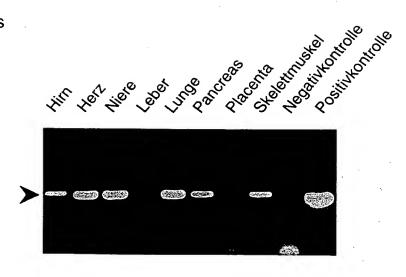
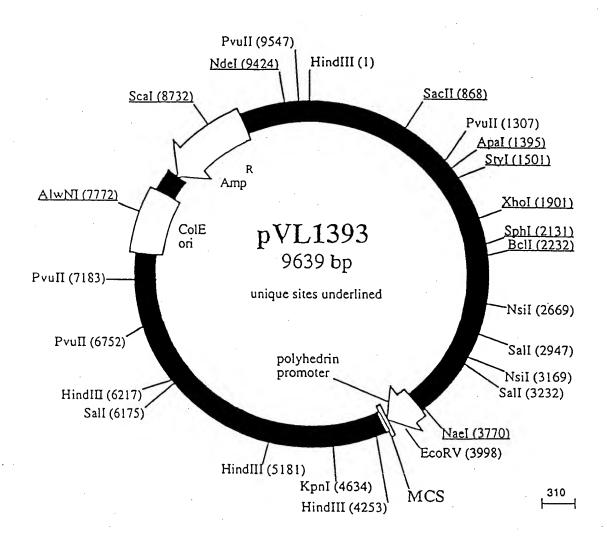
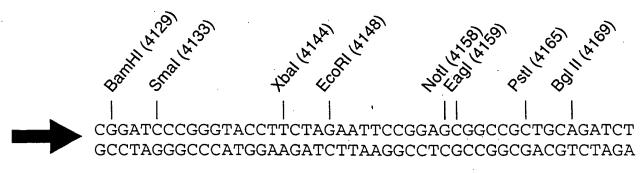


Abb. 5 pVL1393 Baculovirus Transfer-Vektor

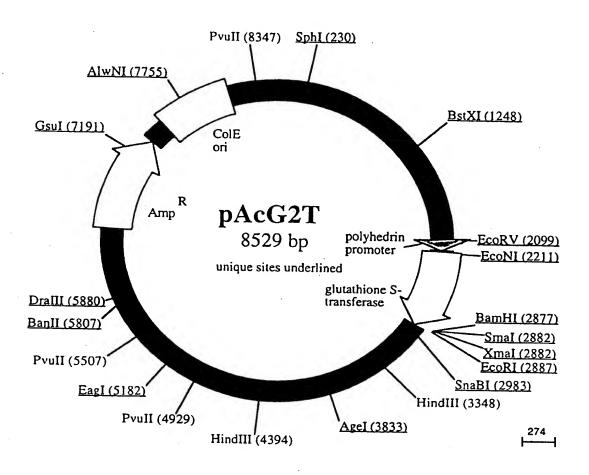


Die Multiple Klonierungsstelle (MCS) von pVL1393 mit den nur einfach vorkommenden Restriktionsschnittstellen



POLYHEDRIN-PROMOTOR





Die Multiple Klonierungsstelle von pAcG2T nach Glutathion-S-Transferase-Sequenz (GST) mit der Thrombinspaltungsstelle und den nur einfach vorkommenden Restriktionsschnittstellen

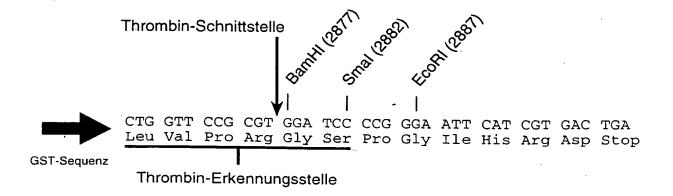
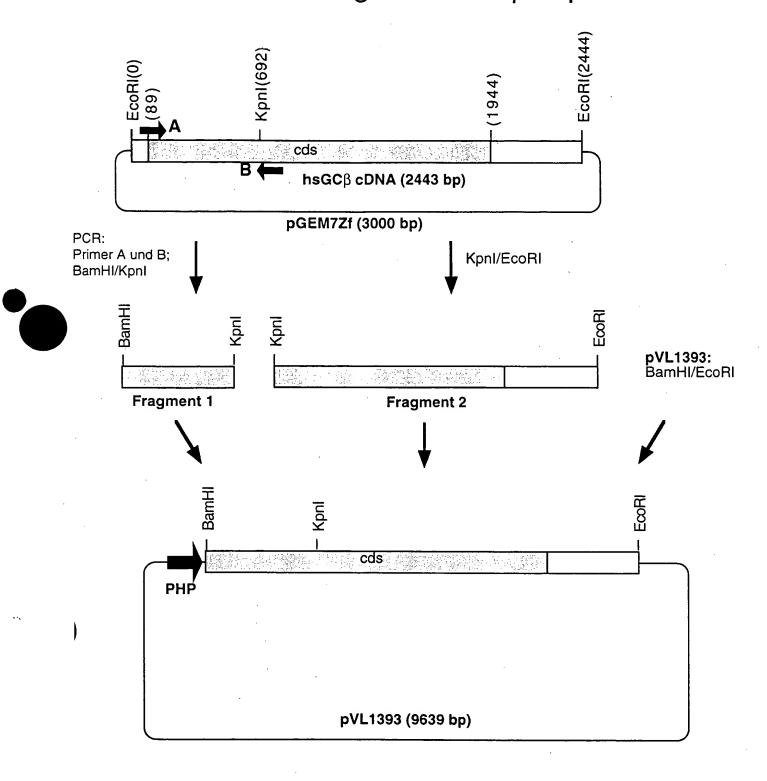


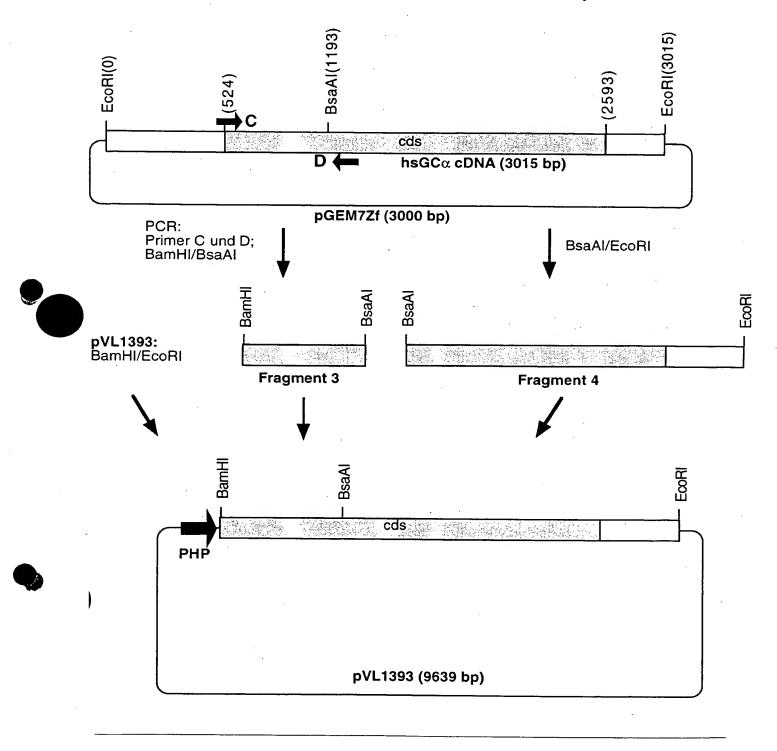
Abb. Klonierung von hach in pVL1393



Primer: A 5' AAAA GGATCC ATGTACGGATTTGTGAAT 3' BamHI (89) (116)

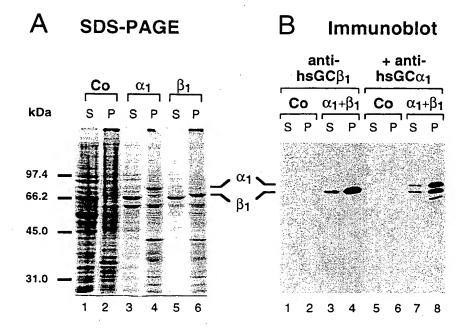
B 3' CCATGG GTCCTTAGTGCGTA 5' (692) Kpnl (711)

Abb. 8: Klomerung von hsGCc in pVL1393



- Primer: C 5' AAAA GGATCC ATGTTCTGCACGAAGCTC 3'
 BamHI (524) (541)
 - D 3' GGAGGGACGAAGGTATTA 5' (1232) (1249)

Abb. 9





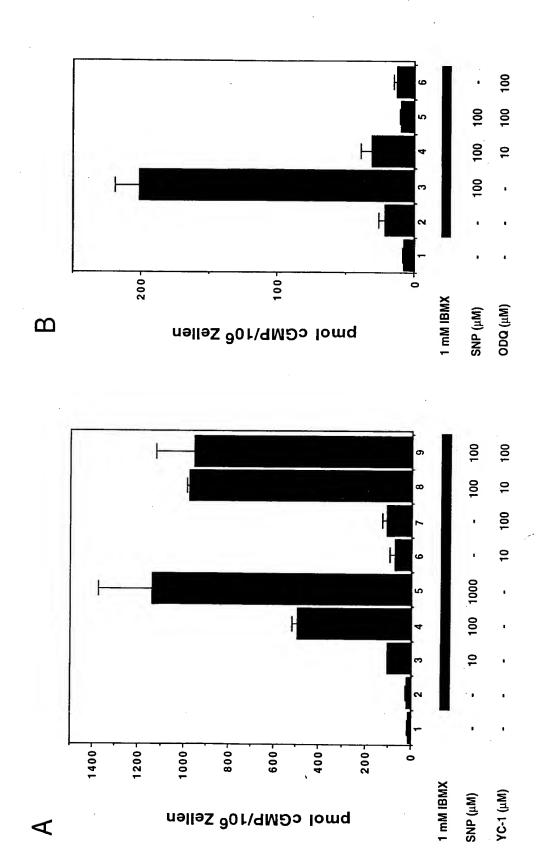


Abb. T1

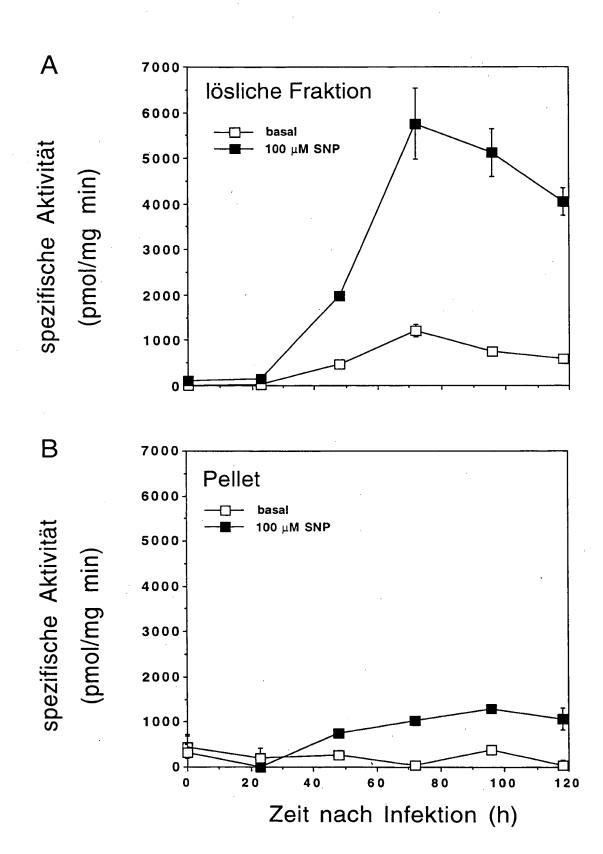
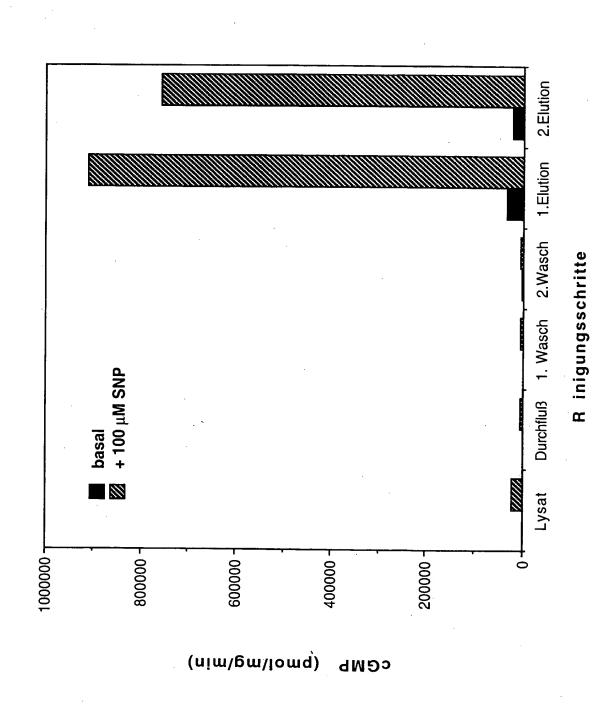
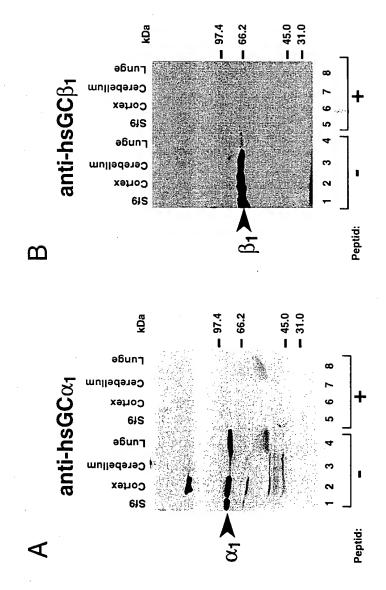


Abb. 12: Reinigung von GST-hsGCalpha1/beta1 an GSH-Sepharose 4B





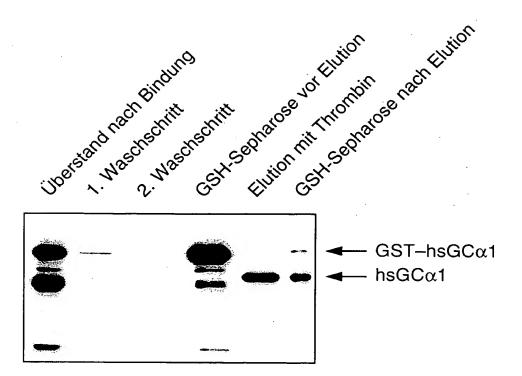


Abb. 15: Nachweis der Aufreinigung von hsGC α 1/ β 1 im gefärbten SDS-Polyacrylamidgel

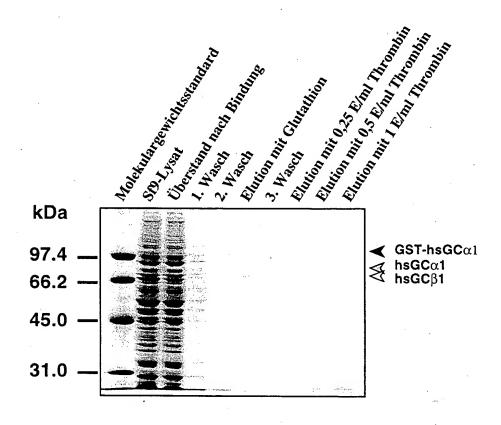


Abb. 16: Konstruktion des hsGC-Adenovektors

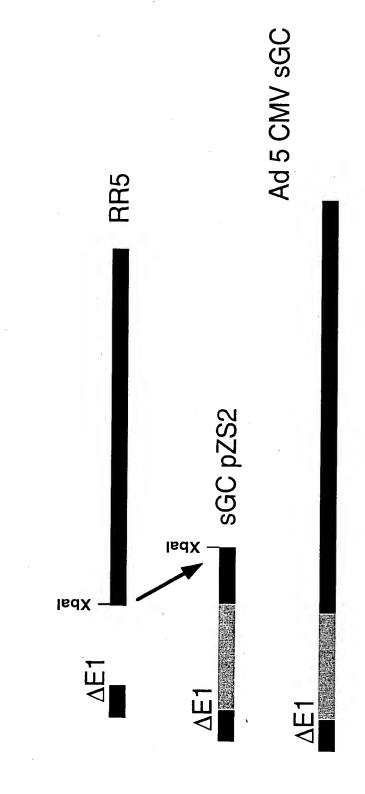
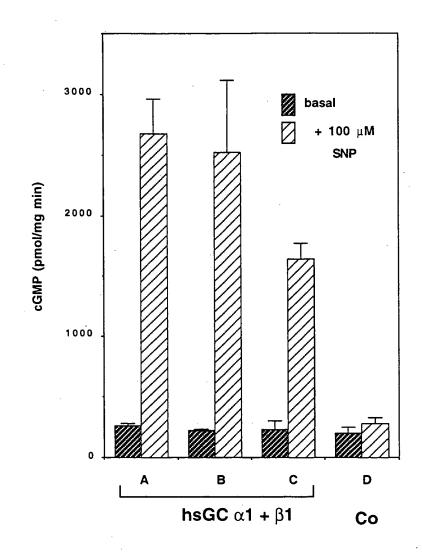


Abb. 17: Expression von humaner sGC in adenovirus-infizierten EA.hy926 Zellen



CCCTTATGGC GATTGGGCGG CTGCAGAGAC CAGGACTCAG TTCCCCTGCC CTAGTCTGAG CCTAGTGGGT GGGACTCAGC TCAGAGTCAG TTTTCCAGAA GCAGGTTTCA GTGCAGAGTT TTCCTACACT TTTCCTGCGC TAGAGCAGCG AGCAGCCTGG AACAGACCCA GGCGGAGGAC ACCTGTGGGG GAGGGAGCGC CTGGAGGAGC TTAGAGACCC CAGCCGGGCG TGATCTCACC ATGTGCGGAT TTGCGAGGCG CGCCCTGGAG CTGCTAGAGA TCCGGAAGCA CAGCCCCGAG GTGTGCGAAG CCACCAAGAC TGCGGCTCTT GGAGAAAGCG TGAGCAGGGG GCCACCGCGG TCTCCGCGCC TGTCTGCACC CTGTCGCCTG AGCTGCCTGA CAGTGACAAT GACATCCCAG TTACCAGTGT CCTTGAATTG ATAGTGGCTT CTGTTTGTCA GTCTCATATA AGAACTACAG CTCATCAGGA GGAGATCGCA GCAGGGTAAG AGACACCAAC ACCATGTTCT GCACGAAGCT CAAGGATCTC AAGATCACAG GAGAGTGTCC TTTCTCCTTA CTGGCACCAG GTCAAGTTCC TAACGAGTCT TCAGAGGAGG CAGCAGGAAG CTCAGAGAGC TGCAAAGCAA CCGTGCCCAT CTGTCAAGAC ATTCCTGAGA AGAACATACA AGAAAGTCTT CCTCAAAGAA AAACCAGTCG GAGCCGAGTC TATCTTCACA CTTTGGCAGA GAGTATTTGC AAACTGATTT TCCCAGAGTT TGAACGGCTG AATGTTGCAC TTCAGAGAAC ATTGGCAAAG CACAAAATAA AAGAAAGCAG GAAATCTTTG GAAAGAGAAG ACTTTGAAAA AACAATTGCA GAGCAAGCAG TTGCAGCAGG AGTTCCAGTG GAGGTTATCA AAGAATCTCT TGGTGAAGAG GTTTTTAAAA TATGTTACGA GGAAGATGAA AACATCCTTG GGGTGGTTGG AGGCACCCTT AAAGATTTTT TAAACAGCTT CAGTACCCTT CTGAAACAGA GCAGCCATTG CCAAGAAGCA GGAAAAAGGG GCAGGCTTGA GGACGCCTCC ATTCTATGCC TGGATAAGGA GGATGATTTT CTACATGTTT ACTACTTCTT CCCTAAGAGA ACCACCTCCC TGATTCTTCC CGGCATCATA AAGGCAGCTG CTCACGTATT ATATGAAACG GAAGTGGAAG TGTCGTTAAT GCCTCCCTGC TTCCATAATG ATTGCAGCGA GTTTGTGAAT CAGCCCTACT TGTTGTACTC CGTTCACATG AAAAGCACCA AGCCATCCCT GTCCCCCAGC AAACCCCAGT CCTCGCTGGT GATTCCCACA TCGCTATTCT GCAAGACATT TCCATTCCAT TTCATGTTTG ACAAAGATAT GACAATTCTG CAATTTGGCA ATGGCATCAG AAGGCTGATG AACAGGAGAG ACTTTCAAGG AAAGCCTAAT TTTGAAGAAT ACTTTGAAAT TCTGACTCCA AAAATCAACC AGACGTTTAG CGGGATCATG ACTATGTTGA ATATGCAGTT TGTTGTACGA GTGAGGAGAT GGGACAACTC TGTGAAGAAA TCTTCAAGGG TTATGGACCT CAAAGGCCAA ATGATCTACA TTGTTGAATC CAGTGCAATC TTGTTTTTGG GGTCACCCTG TGTGGACAGA TTAGAAGATT TTACAGGACG AGGGCTCTAC CTCTCAGACA TCCCAATTCA CAATGCACTG AGGGATGTGG TCTTAATAGG GGAACAAGCC CGAGCTCAAG ATGGCCTGAA GAAGAGGCTG GGGAAGCTGA AGGCTACCCT TGAGCAAGCCC CACCAAGCCC TGGAGGAGGA GAAGAAAAAG ACAGTAGACC TTCTGTGCTC CATATTTCCC TGTGAGGTTG CTCAGCAGCT GTGGCAAGGG CAAGTTGTGC AAGCCAAGAA GTTCAGTAAT GTCACCATGC TCTTCTCAGA CATCGTTGGG TTCACTGCCA TCTGCTCCCA GTGCTCACCG CTGCAGGTCA TCACCATGCT CAATGCACTG TACACTCGCT TCGACCAGCA GTGTGGAGAG CTGGATGTCT ACAAGGTGGA GACCATTGGC GATGCCTATT GTGTAGCTGG GGGATTACAC AAAGAGAGTG ATACTCATGC TGTTCAGATA GCGCTGATGG CCCTGAAGAT GATGGAGCTC TCTGATGAAG TTATGTCTCC CCATGGAGAA CCTATCAAGA TGCGAATTGG ACTGCACTCT GGATCAGTTT TTGCTGGCGT CGTTGGAGTT AAAATGCCCC GTTACTGTCT TTTTGGAAAC AATGTCACTC TGGCTAACAA ATTTGAGTCC TGCAGTGTAC CACGAAAAAT CAATGTCAGC CCAACAACTT ACAGATTACT CAAAGACTGT CCTGGTTTCG TGTTTACCCC TCGATCAAGG GAGGAACTTC CACCAAACTT CCCTAGTGAA ATCCCCGGAA TCTGCCATTT TCTGGATGCT TACCAACAAG GAACAAACTC AAAACCATGC TTCCAAAAGA AAGATGTGGA AGATGGCAAT GCCAATTTTT TAGGCAAAGC ATCAGGAATA GATTAGCAAC CTATATACCT ATTTATAAGT CTTTGGGGTT TGACTCATTG AAGATGTGTA GAGCCTCTGA AAGCACTTTA GGGATTGTAG ATGGCTAACA AGCAGTATTA AAATTTCAGG AGCCAAGTCA CAATCTTTCT CCTGTTTAAC ATGACAAAAT GTACTCACTT CAGTACTTCA GCTCTTCAAG AAAAAAAAA AAACCTTAAA AAGCTACTTT TGTGGGAGTA TTTCTATTAT ATAACCAGCA CTTACTACCT GTACTCAAAA TTCAGCACCT TGTACATATA TCAGATAATT GTAGTCAATT GTACAAACTG ATGGAGTCAC CTGCAATCTC ATATCCTGGT AAAAAAAAA AAAAA





MetTyrGlyPheValAsnHisAlaLeuGluLeuLeuValIleArgAsn TyrGlyProGluValTrpGluAspIleLysLysGluAlaGlnLeuAsp GluGluGlyGlnPheLeuValArgIleIleTyrAspAspSerLysThr TyrAspLeuValAlaAlaAlaSerLysValLeuAsnLeuAsnAlaGly GluIleLeuGlnMetPheGlyLysMetPhePheValPheCysGlnGlu SerGlyTyrAspThrIleLeuArgValLeuGlySerAsnValArgGlu PheLeuGlnAsnLeuAspAlaLeuHisAspHisLeuAlaThrIleTyr ProGlyMetArgAlaProSerPheArgCysThrAspAlaGluLysGly LysGlyLeuIleLeuHisTyrTyrSerGluArgGluGlyLeuGlnAsp IleValIleGlyIleIleLysThrValAlaGlnGlnIleHisGlyThr GluIleAspMetLysValIleGlnGlnArgAsnGluGluCysAspHis ThrGlnPheLeuIleGluGluLysGluSerLysGluGluAspPheTyr GluAspLeuAspArgPheGluGluAsnGlyThrGlnGluSerArgIle SerProTyrThrPheCysLysAlaPheProPheHisIleIlePheAsp ${\tt ArgAspLeuValValThrGlnCysGlyAsnAlaIleTyrArgValLeu}$ ProGlnLeuGlnProGlyAsnCysSerLeuLeuSerValPheSerLeu ValArgProHisIleAspIleSerPheHisGlyIleLeuSerHisIle AsnThrValPheValLeuArgSerLysGluGlyLeuLeuAspValGlu LysLeuGluCysGluAspGluLeuThrGlyThrGluIleSerCysLeu ArgLeuLysGlyGlnMetIleTyrLeuProGluAlaAspSerIleLeu PheLeuCysSerProSerValMetAsnLeuAspAspLeuThrArgArg GlyLeuTyrLeuSerAspIleProLeuHisAspAlaThrArgAspLeu ValLeuLeuGlyGluGlnPheArgGluGluTyrLysLeuThrGlnGlu LeuGluIleLeuThrAspArgLeuGlnLeuThrLeuArgAlaLeuGlu AspGluLysLysLysThrAspThrLeuLeuTyrSerValLeuProPro SerValAlaAsnGluLeuArgHisLysArgProValProAlaLysArg TyrAspAsnValThrIleLeuPheSerGlyIleValGlyPheAsnAla PheCysSerLysHisAlaSerGlyGluGlyAlaMetLysIleValAsn LeuLeuAsnAspLeuTyrThrArgPheAspThrLeuThrAspSerArg LysAsnProPheValTyrLysValGluThrValGlyAspLysTyrMet ThrValSerGlyLeuProGluProCysIleHisHisAlaArgSerIle CysHisLeuAlaLeuAspMetMetGluIleAlaGlyGlnValGlnVal AspGlyGluSerValGlnIleThrIleGlyIleHisThrGlyGluVal ValThrGlyValIleGlyGlnArgMetProArgTyrCysLeuPheGly AsnThrValAsnLeuThrSerArgThrGluThrThrGlyGluLysGly LysIleAsnValSerGluTyrThrTyrArgCysLeuMetSerProGlu AsnSerAspProGlnPheHisLeuGluHisArgGlyProValSerMet ${\tt LysGlyLysLysGluProMetGlnValTrpPheLeuSerArgLysAsn}$ ThrGlyThrGluGluThrLysGlnAspAspAspEnd



Phe Thr Pro Arg Ser Arg Glu Glu Leu Pro Pro Asn Phe Pro



 $LysGlyLysLysGluProMetGlnValTrpPheLeuSerArgLysAsn\\ThrGlyThrGluGluThr$





oberer Primer

AAAAGGATCC ATGTTCTGCA CGAAGCTC

unterer Primer

ATTATGGAAG CAGGGAGG

Abb. 25

oberer Primer

AAAAGGATCC ATGTACGGAT TTGTGAAT

unterer Primer

ATGCGTGATT CCTGGGTACC



Creation date: 01-20-2004

Indexing Officer: TKASSAYE - TILAHUN KASSAYE

Team: OIPEBackFileIndexing

Dossier: 09762767

Legal Date: 06-27-2003

No.	Doccode	Number of pages .
1	SRNT	124

Total number of pages: 124

Remarks:

Order of re-scan issued on

				. H
		•		
	A 200 (NO)		r sair júdar	
	* ₁₀₀ **			
	politica security	¥ .		
			*	
Service of	Many Server, N. S.		the section of the se	
				4 · ·
G	e in few of the second	7.		
	*			
		•		

*